

REC'D 03 JAN 2001

WIPO PCT

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

PCT/JP00/07917 3

10.11.00

JP00/7917

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年11月11日

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第321740号

出願人
Applicant(s):

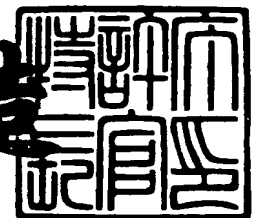
山之内製薬株式会社
財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年12月15日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3103522

【書類名】 特許願

【整理番号】 WP30552913

【提出日】 平成11年11月11日

【あて先】 特許庁長官 近藤 隆彦 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 新規な金属プロテアーゼ

【請求項の数】 7

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内

 【氏名】 山地 昇

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内

 【氏名】 西村 耕一

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県木更津市請西 2 丁目 2 0 番 2 5 号

 【氏名】 小原 収

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県木更津市清見台南 5 丁目 1 番 2 6 号 オータニガーデンハウス B - 4

 【氏名】 長瀬 隆弘

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県木更津市八幡台 5 丁目 2 番 1 1 号

 【氏名】 野村 信夫

【特許出願人】

 【識別番号】 000006677

 【氏名又は名称】 山之内製薬株式会社

【特許出願人】

 【識別番号】 596175810

 【氏名又は名称】 財団法人 かずさディー・エヌ・エー研究所

【代理人】

【識別番号】 100088616

【弁理士】

【氏名又は名称】 渡邊 一平

【電話番号】 03-5820-0535

【選任した代理人】

【識別番号】 100089200

【弁理士】

【氏名又は名称】 長井 省三

【電話番号】 03-5916-5111

【選任した代理人】

【識別番号】 100098501

【弁理士】

【氏名又は名称】 森田 拓

【電話番号】 03-5916-5111

【選任した代理人】

【識別番号】 100109357

【弁理士】

【氏名又は名称】 矢野 恵美子

【電話番号】 03-5916-5111

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 009689

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9704254

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規な金属プロテアーゼ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号3で表されるアミノ酸配列の第1番から第653番のアミノ酸配列を含む金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物である金属プロテアーゼ。

【請求項 2】 配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号3で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号3で表されるアミノ酸配列の第1番から第653番のアミノ酸配列を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物である金属プロテアーゼ。

【請求項 3】 請求項1又は2記載の金属プロテアーゼのアミノ酸配列をコードする遺伝子。

【請求項 4】 請求項3記載の遺伝子を含むベクター。

【請求項 5】 請求項4記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 6】 請求項5記載の宿主細胞を用いる請求項 1 又は2記載の金属プロテアーゼの製造方法。

【請求項 7】 請求項1又は2記載の金属プロテアーゼに対する抗体。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規ADAMTS蛋白、該ADAMTS蛋白をコードする遺伝子、該ADAMTS蛋白の製造方法、該ADAMTS蛋白を用いたプロテアーゼ活性測定法に関するものである。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

ADAMTS (A Disintegrin and Metalloprotease with Thrombospondin motif) は、Cys残基を多く含むディスインテグリン様ドメイン、金属プロテアーゼ様ド

メインおよびトロンボスポンジンI型繰り返し配列（以下、TSP-1繰り返し配列という）を含む分子である。ADAMTS分子としてはプロコラーゲンI N-プロテイナーゼが古くより知られていたが、最近になり、マウスADAMTS-1が発見され（Kuno, K. et al., J. Biol. Chem., 272, 556-562, 1997; Kuno, K. et al., J. Biol. Chem., 273, 13912-13917, 1998）、分子群の存在が示唆された。1999年になるとADAMTS分子の遺伝子クローニングの報告が相次ぎ、現在までに、全長ヒト型全長ORF（翻訳領域）としては、マウスADAMTS-1のヒトオースログと考えられるMET H-1（Vazquez F. et al., J. Biol. Chem., 274, 23349-57, 1999）に加え、MET H2（Vazquez F. et al., J. Biol. Chem., 274, 23349-57, 1999）、aggrecanase-1（Tortorella M.D. et al., Science., 284, 1664-1666, 1999）、ADAMTS11（aggrecanase-2）（Abbaszade I, et al., J. Biol. Chem., 274, 23443-23450, 1999）、ADAMTS-6（Hurskainen T.L. et al., J. Biol. Chem., 274, 25555-25563, 1999）、ADAMTS-7（Hurskainen T.L. et al., J. Biol. Chem., 274, 25555-25563, 1999）が報告された。また、本発明者らのグループは、部分配列ではあるが、ADAMTS分子としてKIAA0366をデータベース登録している（Nagase T. et al., DNA Res., 4, 141-150, 1997; Tang, B. L. et al., FEBS Lett., 445, 223-225, 1999）。これらの分子は、ドメイン構造の違いのみならず、HExxH(HisGluXaaXaaHis)からなる亜鉛結合コンセンサス配列を有する金属プロテアーゼ様ドメインの相同性という点でも、ADAMファミリーの中に独立したサブファミリーを構成している。これまでに報告されているADAMTS分子はいずれもプロペプチドと金属プロテアーゼ様ドメインとの間にfurinプロテアーゼの認識配列を有しており、現在までに組換え蛋白の発現が報告されている例では、同部位でプロペプチドが切断除去され、成熟蛋白となることが示されている（Kuno, K. et al., J. Biol. Chem., 273, 13912-13917, 1998; Vazquez F. et al., J. Biol. Chem., 274, 23349-57, 1999; Tortorella M.D. et al., Science., 284, 1664-1666, 1999; Abbaszade I, et al., J. Biol. Chem., 274, 23443-23450, 1999）。

【 0 0 0 3 】

ADAMTS分子の中で、プロコラーゲンI N-プロテイナーゼは、I型コラーゲンプロ体のN末部の切断除去酵素として、I型コラーゲンのプロ体から成熟型への転換

に関与し、コラーゲン線維の形成に重要な役割を果たしている。その遺伝子の異常とVIIC型Ehlers-Danlos症との関連性が示されている (Colige A. et al., Am. J. Hum. Genet., 65, 308-317, 1999)。aggrecanase-1 (ADAMTS4) およびADAMTS11 (aggrecanase-2) には、細胞外基質アグリカンをGlu373-Ala374の間で選択的に切断する活性が示され、関節炎や変形性関節症における軟骨細胞外基質アグリカンの分解の本体の酵素である可能性が示唆されている (Tortorella M.D. et al., Science., 284, 1664-1666, 1999; Abbaszade I, et al., J. Biol. Chem., 274, 23443-23450, 1999)。また、マウスADAMTS-1にも、広範囲なプロテアーゼと反応するアルファ2マクログロブリン (以下 $\alpha 2M$) との反応産物を生成することが報告され、蛋白分解活性を有することが示されている (Kuno K, et al., J. Biol. Chem., 274, 18821-18826, 1999)。この他の分子についても、今後、プロテアーゼ活性の有無が検討され、その活性と生理的意義の関連性が探られていくと考えられる。

【0004】

一方、プロテアーゼ活性以外の機能に関しても解析が行われている。ADAMTS分子であるMETH-1とMETH-2には強力な血管新生阻害活性があることが報告され (Vazquez F. et al., J. Biol. Chem., 274, 23349-23357, 1999)、蛋白自体の癌治療領域での応用の可能性が検討されている。また、線虫において、変異体の解析から、ADAMTS分子が臓器形成、特に性腺の形成に重要な役割を果たしていることが報告されている (Bleiloch R. et al., Nature, 399, 586-590, 1999)。

このように、ADAMTS分子は多彩な生理機能を有することが強く示唆され、その機能の制御剤もしくは蛋白自体の医薬品応用の可能性も高いと期待される状況にあった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、創薬標的分子としての可能性が非常に高い新規ADAMTS蛋白をコードする遺伝子を単離・同定し、それらの発現生産系を構築し、組換え蛋白を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

このような状況下、本発明者らは鋭意検討した結果、上記ADAMTSファミリーに分類される新規蛋白をコードする遺伝子を単離し、全長ORF配列を決定して、組み換え蛋白の生産を可能にすることに成功した。

さらにまた、該遺伝子を含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該宿主細胞を用いた同新規蛋白の製造法を確立した。これにより、該蛋白のプロテアーゼ活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体のスクリーニングを可能にし、本発明を完成した。

加えて、該蛋白はプロテアーゼ活性のうちの1つである細胞外基質アグリカンにGlu373-Ala374の間で選択的に切断する活性、すなわちアグリカナゼ活性を有することを見だし、このことより該蛋白及び該蛋白の活性を有意に修飾する化合物の医薬品としての可能性が示唆された。

【0007】

即ち本発明は、

(1) 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号3で表されるアミノ酸配列の第1番から第653番のアミノ酸配列を含む金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物である金属プロテアーゼ、

(2) 配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号3で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号3で表されるアミノ酸配列の第1番から第653番のアミノ酸配列を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物である金属プロテアーゼ、

(3) (1) 又は (2) 記載の金属プロテアーゼのアミノ酸配列をコードする遺伝子、

(4) (3) 記載の遺伝子を含むベクター、

(5) (4) 記載のベクターを含む宿主細胞、

(6) (5) 記載の宿主細胞を用いる (1) 又は (2) の金属プロテアーゼの製造方法、

(7) (1) 又は (2) 記載の金属プロテアーゼに対する抗体、
に関する。

【 0 0 0 8 】

【発明の実施の形態】

以下、本発明で使用される用語につき説明する。

本明細書中で使用される「金属プロテアーゼ」は、亜鉛コンセンサス配列 (HExxH) を有し、プロテアーゼ活性を有する「金属プロテアーゼ」を意味する。また、「プロテアーゼ」は断りがない限り、「蛋白」を表す。

本発明の新規金属プロテアーゼは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列若しくは配列番号3で表されるアミノ酸配列の第1番から第653番のアミノ酸配列を含み、かつ、蛋白分解能を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物である金属プロテアーゼならいずれでもよい。

ここで、「金属プロテアーゼの同効物」とは、配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号3で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列、若しくは配列番号3で表されるアミノ酸配列の第1番から第653番のアミノ酸配列の中のいずれかの1乃至複数個の部位において、1乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていてもよく、かつ、蛋白分解能を有する金属プロテアーゼである。「金属プロテアーゼの同効物」として好ましくは、SNPなどのアミノ酸置換で生じた該金属プロテアーゼを示す。

本発明の新規金属プロテアーゼとして好ましくは配列番号1若しくは3記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列若しくは配列番号3で表されるアミノ酸配列の第1番から第653番のアミノ酸配列を有するポリペプチドであり、特に配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列若しくは配列番号3で表されるアミノ酸配列の第1番から第653番のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

【 0 0 0 9 】

また、本発明の新規金属プロテアーゼをコードする遺伝子は、上記の金属プロテアーゼをコードする塩基配列を含む遺伝子、即ち、配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号3で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列若しくは配列番号3で表されるアミノ酸配列の第1番から第653番のアミノ酸配列で示される金属プロテアーゼ、又は該金属プロテアーゼの同効物をコードする塩基配列を含み、かつ、蛋白分解能を有する金属プロテアーゼ遺伝子ならいずれでもよい。

本発明の新規金属プロテアーゼをコードする遺伝子として好ましくは、配列番号2記載の塩基配列の1番から1749番若しくは1番から2850番、配列番号4記載の塩基配列の1番から1959番若しくは1番から5805番を有する遺伝子であり、特に好ましくは配列番号2記載の塩基配列の1番から1749番、配列番号4記載の塩基配列の1番から1959番を有する遺伝子である。

本発明の新規金属プロテアーゼはさまざまなプロテアーゼ活性を有しているが、その中の1つであるアグリカナーゼ活性を有する点が特に注目すべき点である。

【0010】

ここで、本発明の新規蛋白をコードする遺伝子、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の新規蛋白の製造方法、本発明の新規蛋白の活性を検出する方法、本発明の新規蛋白に反応する抗体の製造方法、本発明の新規蛋白の活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体のスクリーニング方法を以下の1)～7)に記載する。

1) 新規蛋白遺伝子の製造方法

a) 第1製造法—PCRを用いた方法

本発明の新規蛋白を産生する能力を有するヒト細胞あるいは組織からmRNAを抽出する。次いでこのmRNAを鋳型として該新規蛋白mRNAまたは一部のmRNA領域をはさんだ2種類のプライマーを作製する。denature温度、変性剤添加条件などを改良し、本発明の配列番号1又は3で表されるアミノ酸配列の一部を含む蛋白のそれぞれに適した逆転写酵素—ポリメラーゼ連鎖反応（以下RT-PCRという）を行うことにより、該新規蛋白の全長cDNAまたはその一部を得ることができる。もしくは

、本発明の新規蛋白を産生する能力を有するヒト細胞あるいは組織から調製した mRNA から逆転写酵素により作製した cDNA あるいは市販の該ヒト細胞あるいは組織由来の cDNA を鋳型とした、ポリメラーゼ連鎖反応（以下、PCR という）を行うことにより、該新規蛋白の全長 cDNA またはその一部を得ることができる。さらに、得られた新規蛋白の全長 cDNA またはその一部を適当な発現ベクターに組み込むことにより、宿主細胞で発現させ、該新規蛋白を製造することができる。

まず、本発明の新規蛋白の産生能力を有する細胞あるいは組織から該プロテアーゼをコードするものを包含する mRNA を既知の方法により抽出する。抽出法としては、グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジン・チオシアネート・グアニジン・塩酸法等が挙げられるが、好ましくはグアニジン・チオシアネート塩化セシウム法が挙げられる。該プロテアーゼの産生能力を有する細胞あるいは組織は、該プロテアーゼをコードする塩基配列を有する遺伝子あるいはその一部を用いたノーザンブロッティング法、該プロテアーゼに特異的な抗体を用いたウェスタンブロッティング法などにより特定することができる。

mRNA の精製は常法に従えばよく、例えば mRNA をオリゴ（d T）セルロースカラムに吸着・溶出させ、精製することができる。さらに、ショ糖密度勾配遠心法等により mRNA をさらに分画することもできる。また、mRNA を抽出せずとも、市販されている抽出精製済みの mRNA を用いても良い。

次に、精製された mRNA をランダムプライマー、オリゴ d T プライマーまたはカスタム合成したプライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行い第 1 鎖 cDNA を合成する。この合成は常法によって行うことができる。得られた第 1 鎖 cDNA を用い、目的遺伝子の一部の領域をはさんだ 2 種類のプライマーを用いて PCR に供し、目的とする新規蛋白 DNA を増幅する。また、cDNA を合成せずとも、市販の cDNA を用いてもよい。得られた DNA をアガロースゲル電気泳動等により分画する。所望により、上記 DNA を制限酵素等で切断し、接続することによって目的とする DNA 断片を得ることもできる。

【 0 0 1 1 】

b) 第 2 製造法

本発明の遺伝子は上述の製造法その他、常法の遺伝子工学的手法を用いて製造す

ることもできる。まず、前述の方法で得た mRNA を鋳型として逆転写酵素を用いて 1 本鎖 cDNA を合成した後、この 1 本鎖 cDNA から 2 本鎖 cDNA を合成する。その方法としては S 1 ヌクレアーゼ法 (Efstratiadis, A. et al., Cell, 7, 279-288, 1976)、Land 法 (Land, H. et al., Nucleic Acids Res., 9, 2251-2266, 1981)、O. Joon Yoo 法 (Yoo, O. J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1049-1053, 1983)、Okayama-Berg 法 (Okayama, H. and Berg, P., Mol. Cell. Biol., 2, 161-170, 1982) などが挙げられる。

次に、上述の方法で得られる組換えプラスミドを大腸菌、例えば DH5 α 株、HB101 株、JM109 株等に導入して形質転換させて、テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイシン等に対する薬剤耐性を指標として組換え体を選択することができる。宿主細胞の形質転換は、例えば、宿主細胞が大腸菌の場合には Hanahan の方法 (Hanahan, D. J., Mol. Biol., 166, 557-580, 1983)、すなわち CaCl_2 や MgCl_2 または RbCl を共存させて調製したコンピテント細胞に該組換え DNA 体を加える方法により実施することができる。もちろん、市販のコンピテント細胞を使用しても構わない。なお、ベクターとしてはプラスミド以外にもラムダ系などのファージベクターも用いることができる。

上記により得られる形質転換株から、目的の新規蛋白の DNA を有する株を選択する方法としては、例えば以下に示す各種方法を採用できる。

【 0 0 1 2 】

① 合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるスクリーニング法

本発明の新規蛋白の全部または一部に対応するオリゴヌクレオチドを合成し (この場合コドン使用頻度を用いて導いたヌクレオチド配列または考えられるヌクレオチド配列を組合せた複数個のヌクレオチド配列のどちらでもよく、また後者の場合、イノシンを含ませてその種類を減らすこともできる)、これをプローブ (^{32}P 又は ^{33}P で標識する) として、形質転換株の DNA を変性固定したニトロセルロースフィルターやナイロンフィルターとハイブリダイズさせ、得られた陽性株を検索して、これを選択する。

② ポリメラーゼ連鎖反応により作製したプローブを用いるスクリーニング法

本発明の新規蛋白の一部に対応するセンスプライマーとアンチセンスプライマ

一のオリゴヌクレオチドを合成し、これらを組合せてポリメラーゼ連鎖反応(Saiki, R. K. et al., Science 239, 487-491, 1988)を行い、目的の新規蛋白の全部又は一部をコードするDNA断片を増幅する。ここで用いる鋳型DNAとしては、該新規蛋白を産生する細胞のmRNAより逆転写反応にて合成したcDNA、またはゲノムDNAを用いることができる。このようにして調製したDNAを断片を ^{32}P 又は ^{33}P で標識し、これをプローブとして用いてコロニーハイブリダイゼーションまたはブラークハイブリダイゼーションを行うことにより目的のクローンを選択する。

③ 他の動物細胞で新規蛋白を産生させてスクリーニングする方法

形質転換株を培養し、遺伝子を増幅させ、その遺伝子を動物細胞にトランスフェクトし（この場合、自己複製可能で転写プロモーター領域を含むプラスミドもしくは動物細胞の染色体に組み込まれ得るようなプラスミドのいずれでもよい）、遺伝子にコードされた蛋白を細胞外に産生させる。本発明の新規蛋白に対する抗体を用いて該新規蛋白を検出することにより、元の形質転換株より目的の新規蛋白をコードするcDNAを有する株を選択する。

④ 本発明の新規蛋白に対する抗体を用いて選択する方法

あらかじめ、cDNAを発現ベクターに組み込み、形質転換株の培養上清、細胞内もしくは細胞表面に蛋白を産生させ、本発明の新規蛋白に対する抗体および該抗体に対する2次抗体を用いて、所望の新規蛋白産生株を検出し、目的の株を選択する。

⑤ セレクティブ・ハイブリダイゼーション・トランスレーションの系を用いる方法

形質転換株から得られるcDNAを、ニトロセルロースフィルター等にブロットし本発明の新規蛋白産生細胞からのmRNAをハイブリダイズさせた後、cDNAに結合したmRNAを解離させ、回収する。回収されたmRNAを蛋白翻訳系、例えばアフリカツメガエルの卵母細胞への注入や、ウサギ網状赤血球ライゼートや小麦胚芽等の無細胞系で蛋白に翻訳させる。本発明の新規蛋白に対する抗体を用いて検出して、目的の株を選択する。

得られた目的の形質転換株より本発明の新規蛋白をコードするDNAを採取する方法は、公知の方法(Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning-A Laboratory

Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989) 等の遺伝子操作実験マニュアルに従い実施できる。例えば細胞よりプラスミドDNAに相当する画分を分離し、該プラスミドDNAよりcDNA領域を切り出すことにより行ない得る。

【0013】

c) 第3製造法

本発明の新規蛋白遺伝子は、化学合成法によって製造したDNA断片を結合することによっても製造できる。各DNAは、DNA合成機[例えば、Oligo 1000M DNA Synthesizer (Beckman社製)、あるいは、394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems社製)など]を用いて合成することができる。

【0014】

d) 第4製造法

本発明の新規蛋白遺伝子は、新規蛋白の情報に基づいて、例えばホスファイト・トリエステル法(Hunkapiller, M. et al., Nature, 10, 105-111, 1984)等の常法に従い、核酸の化学合成により製造することもできる。なお、所望アミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる(Crantham, R. et al., Nucleic Acids Res., 9, r43-r74, 1981)。さらに、これら塩基配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用したサイトスペシフィック・ミュータジェネシス(site specific mutagenesis) (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662-5666, 1984)等に従うことができる。

【0015】

以上、a)乃至d)により得られるDNAの配列決定は、例えばマキシムーギルバートの化学修飾法(Maxam, A. M. and Gilbert, W., "Methods in Enzymology", 65, 499-559, 1980)やジデオキシヌクレオチド鎖終結法(Messing, J. and Vieira, J., Gene, 19, 269-276, 1982)等により行うことができる。

また、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の新規蛋白は、下記の方法によって得ることができる。

2) 本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の新規蛋白の組み換え蛋白の

製造方法

単離された本発明の新規蛋白をコードする遺伝子を含む断片は、適当なベクター-DNAに再び組込むことにより、真核生物および原核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。さらに、これらのベクターに適当なプロモーターおよび形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現させることが可能である。

例えば、真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、サルの細胞であるCOS細胞(Gluzman, Y. Cell, 23, 175-182, 1981)やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞(CHO)のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株 (Urlaub, G. and Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220, 1980)、ヒト胎児腎臓由来HEK293細胞および同細胞にEpstein Barr VirusのEBNA-1遺伝子を導入した293-EBNA細胞 (Invitrogen社) 等がよく用いられるが、これらに限定されるわけではない。

脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列等を有するものを使用でき、これはさらに必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40の初期プロモーターを有するpSV2dhfr (Subramani, S., et al. Mol. Cell. Biol., 1, 854-864, 1981)、ヒトのelongation factorプロモーターを有するpEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990)、cytomegalovirusプロモーターを有するpCEP4(Invitrogen社製) 等を例示できるが、これに限定されない。

宿主細胞として、COS細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40複製起点を有し、COS細胞において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、転写終結シグナルおよびRNAスプライス部位を備えたものを用いることができ、例えば、pME18S (Maruyama, K. and Takebe, Y., Med. Immunol., 20, 27-32, 1990)、pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990)、pCDM8(Seed, B., Nature, 329, 840-842, 1987) 等が挙げられる。該発現ベクターはDEAE-デキストラン法(Luthman, H. and Magnusson, G., Nucleic Acids Res., 11, 1295-1308, 1983)、リン酸カルシウム-D

NA共沈殿法(Graham, F. L. and van der Ed, A. J.,, Virology, 52, 456-457, 1973)、FuGENETM6 Transfection Reagent(Boeringer Mannheim社製)を用いた方法、および電気パルス穿孔法(Neumann, E. et al.,, EMBO J., 1, 841-845, 1982)等によりCOS細胞に取り込ませることができ、かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。

【0016】

また、宿主細胞としてCHO細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、G418耐性マーカーとして機能するneo遺伝子を発現し得るベクター、例えばpRSVneo(Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989)やpSV2-neo(Southern, P. J. and Berg, P., J., Mol. Appl. Genet., 1, 327-341, 1982)等をコ・トランスフェクトし、G418耐性のコロニーを選択することにより新規蛋白を安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。また、宿主細胞として293-EBNA細胞を用いる場合には、Epstein Barr Virusの複製起点を有し、293-EBNA細胞で自己増殖が可能なpCEP4(Invitrogen社製)などの発現ベクターを用いて所望の形質転換細胞を得ることができる。

上記で得られる所望の形質転換細胞は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞外に本発明の新規蛋白が生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば上記COS細胞であればRPMI-1640培地やダルベッコ修飾イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地に必要に応じ牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したものを使用できる。また、上記293-EBNA細胞であれば牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したダルベッコ修飾イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地にG418を加えたものを使用できる。

上記により、形質転換細胞の細胞外に生産される本発明の新規蛋白は、該新規蛋白の物理的性質や生化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作法により、分離・精製することができる。該方法としては、具体的には例えば該新規蛋白を含む培養液を通常の蛋白沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー(ゲル濾過)、吸着クロマトグラフィー、イオン交換体クロマトグラフィー

一、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せ等を例示できる。

本発明の新規蛋白はマーカー配列とインフレーションで融合して発現させることで、該新規蛋白の発現の確認、精製等が可能になる。マーカー配列としては、例えば、FLAG epitope、Hexa-Histidine tag、Hemagglutinin tag、myc epitopeなどがある。また、マーカー配列と該新規蛋白の間にエンテロキナーゼ、ファクターXa、トロンビンなどのプロテアーゼが認識する特異的なアミノ酸配列を挿入することにより、マーカー配列部分をこれらのプロテアーゼにより切断除去する事が可能である。

【 0 0 1 7 】

3) 本発明の新規蛋白の金属プロテアーゼ活性を検出する方法

本発明の新規蛋白およびその部分ペプチドのプロテアーゼ活性は、本発明の新規蛋白およびその部分ペプチドと以下に挙げる基質とを適当な緩衝液中で混合し、反応させた後、それぞれの基質にあった方法で検出することができる。

基質としては、蛍光若しくは放射線標識の基質、蛍光団、消光団若しくは発色団を有する合成基質、および非標識の基質等が挙げられる。蛍光若しくは放射線標識の基質としては、蛍光若しくは放射線標識されたゼラチン、コラーゲンや合成ペプチド等、蛍光団を有する合成基質としては、Glt-Ala-Ala-Phe-MCA、Lys-MCA、Pyr-Arg-Thr-Lys-Arg-MCA等(ペプチド研究所)、消光団を有する合成基質としては、MOCac-Arg-Pro-Lys-Pro-Tyr-Ala-Nva-Trp-Met(Dnp)-NH₂、MOCac-Tyr-Val-Ala-Asp-Ala-Pro-Lys(Dnp)-NH₂等(ペプチド研究所)、発色団を有する合成基質としては、Ala-pNA、Bz-Tyr-pNA、Pyr-Phe-Leu-pNa等(ペプチド研究所)、非標識の基質としては、カゼイン、コラーゲン、フィブロネクチン、アグリカン、ゼラチン等の蛋白、インスリン等の生理活性ペプチドや合成ペプチド等が挙げられる。合成ペプチドとは非天然型アミノ酸を含むものも含有する。

たとえば、放射線標識した基質や蛍光団、消光団、発色団を有する基質を用いる場合は、液体シンチレーションカウンター、蛍光検出器、分光光度計等、適当な検出器を用いることにより、プロテアーゼ活性を検出することができる。非標識の基質を用いる場合は、SDS-PAGE、HPLC、Zymography等で分解物を判別でき、

プロテアーゼ活性を検出することができる。

【0018】

4) アグリカナーゼ活性を検出する方法

アグリカナーゼ活性を検出するための基質としては、ヒトもしくは他の動物の軟骨・組織より精製したアグリカン、あるいは遺伝子組換えアグリカン、市販のアグリカン（生化学工業）、もしくはそれらの部分蛋白を用いることができる。これらの基質と被試験プロテアーゼを含む細胞・組織培養液、細胞・組織抽出液もしくは（部分）精製標品を反応させ、Glu373-Ala374の間で切断された断片を検出することによりアグリカナーゼ活性を測定することができる。Glu373-Ala374の間で切断された断片の検出には、常法に従い分解断片のN末端配列もしくはC末端配列を決定する手法や、より簡便にGlu373-Ala374の間で切断されることにより生じるC末端のNITGE、N末端のARGSVを特異的に認識する抗ネオエピトープ抗体（Hughes C. E. et al., Biochem J., 305, 799-804, 1995）を用いたELISAやウエスタンブロッティング等の免疫学的手法を用いることができる。

【0019】

5) 本発明の新規蛋白に反応する抗体の作製方法

本発明の新規蛋白に反応する抗体、例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体は、各種動物に該新規蛋白や該新規蛋白の断片を直接投与することで得ることができる。また、本発明新規蛋白をコードする遺伝子を導入したプラスミドを用いてDNAワクチン法（Raz, E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9519-9523, 1994; Donnelly, J. J. et al., J. Infect. Dis., 173, 314-320, 1996）によっても得ることができる。

ポリクローナル抗体は該新規蛋白またはその断片をフロイント完全アジュバントなどの適当なアジュバントに乳濁し、腹腔、皮下また静脈等に免疫して感作した動物、例えばウサギ、ラット、ヤギ、またはニワトリ等の血清または卵から製造される。このように製造されたポリクローナル抗体は常法の蛋白質単離精製法により、分離精製することができ、常法の蛋白質単離精製法としては例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、DEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイト、プロテインAアガロース等によるクロマトグラフィー法が挙げられ

る。

モノクローナル抗体は、ケーラーとミルスタインの細胞融合法 (Kohler, G. and Milstein, C., Nature, 256, 495-497, 1975) により当業者が容易に製造することが可能である。

すなわち、本発明新規蛋白またはその断片をフロイント完全アジュバントなどの適当なアジュバントに乳濁した乳濁液を数週間おきにマウスの腹腔、皮下または静脈に数回繰り返し接種することにより免疫する。最終免疫後、脾臓細胞を取り出し、ミエローマ細胞と融合してハイブリドーマを作製する。

ハイブリドーマを得るためのミエローマ細胞としては、ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損やチミジンキナーゼ欠損のようなマーカーを持つミエローマ細胞、例えば、マウスミエローマ細胞株P3X63Ag8.U1、を利用する。また、融合剤としてはポリエチレングリコールを利用する。さらにはハイブリドーマ作製における培地として、イーグル最小必須培地、ダルベッコ修飾最小必須培地、RPMI-1640などの通常よく用いられているものに適宜10～30%の牛胎児血清を加えて用いる。融合株はHAT選択法により選択する。ハイブリドーマのスクリーニングは培養上清を用い、ELISA法、免疫組織染色法などの周知の方法または前記のスクリーニング法により行い、目的の抗体を分泌しているハイブリドーマのクローンを選択する。また、限界希釈法によって、サブクロニングを繰り返すことによりハイブリドーマの単クローン性を保証する。このようにして得られるハイブリドーマは培地中で数日間、あるいはプリスタンで前処理したBALB/c系マウスの腹腔内で10～20日培養することで精製可能な量の抗体が産生される。このように製造されたモノクローナル抗体は培養上清あるいは腹水から常法の蛋白質単離精製法により分離精製することができる。

以上のように分離精製された抗体につき、常法により、ペプシン、パパイン等の蛋白質分解酵素によって消化を行い、引き続き常法の蛋白質単離精製法により分離精製することで、活性のある抗体の一部分を含む抗体断片、例えば、F(ab')₂、Fab、Fab'、Fvを得ることができる。

さらには、本発明新規蛋白に反応する抗体を、クラクソンらやゼベデらの方法 (Clackson, T. et al., Nature, 352, 624-628, 1991; Zebedee, S. et al., P

roc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3175-3179, 1992) により single chain Fv や Fab として得ることも可能である。また、マウスの抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子に置き換えたトランスジェニックマウス (Lonberg, N. et al., Nature, 368, 856-859, 1994) に免疫することでヒト抗体を得ることも可能である。

【 0 0 2 0 】

6) 本発明の新規蛋白の金属プロテアーゼ活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体のスクリーニング方法

本発明のスクリーニング方法は、少なくとも前記 1) 及び 2) で示される製造法で調製された新規蛋白を用いて、該新規蛋白の生化学的な特性に応じた新規蛋白の金属プロテアーゼ活性の修飾の指標を測定する系に被験物質を添加し、該指標を測定する手段を含む。ここで、該測定系としては、公知の各種プロテアーゼ測定系 (鶴 大典・船津 勝編 生物化学実験法 30 「蛋白質分解酵素 I」 学会出版センター、1993、同 31 「蛋白質分解酵素 I」 学会出版センター、1993) を挙げることができ、該文献に記載された処理方法に従い、あるいは準じて、あるいは応用して実施することにより被験物質のスクリーニングを行うことができる。

被験物質としては従来金属プロテアーゼ阻害活性を有することは知られているが該新規蛋白の金属プロテアーゼ活性に対して修飾するか不明な化合物またはペプチド、あるいはケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物やペプチド、コンビナトリアル・ケミストリー技術 (Terrett, N. K. et al., Tetrahedron, 51, 8135-8137, 1995) によって得られた化合物群やファージ・ディスプレイ法 (Felici, F. et al., J. Mol. Biol., 222, 301-310, 1991) などを応用して作製されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の抽出物や培養上清、植物、海洋生物由来の天然成分、動物組織抽出物などもスクリーニングの対象となる。あるいは本発明のスクリーニング法により選択された化合物またはペプチドを化学的または生物学的に修飾した化合物またはペプチドを用いる。

本発明の新規蛋白のプロテアーゼ活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体のスクリーニングには、本発明の新規蛋白またはその部分ペプチドの基質となるも

のであればいずれのものでも使用可能であり、好ましくは前記 3) に記載の基質である。

【 0 0 2 1 】

7) 本発明の新規蛋白のアグリカナーゼ活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体のスクリーニング方法

4) に示したアグリカナーゼ活性の検出法と同様の方法でスクリーニングが可能である。また、本発明の新規蛋白と反応させることにより分解され消滅・減少する添加したアグリカン、組換えアグリカン、市販のアグリカン、もしくはそれらの部分蛋白量を、アグリカナーゼで切断される部位のN側およびC側部分のポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて計測するELISAなどの方法を用いることができる。さらには、本発明の新規蛋白と実施例10-1に示したN末にFLAGタグ、C末にHisタグが付加した組換えアグリカンを反応させて分解され消滅・減少する添加した組換えアグリカン量を抗FLAGタグ、抗HISタグ抗体を用いたELISA等で計測する方法が用いられる。この場合のタグはFLAGタグおよびHisタグに限定されず、また、組換えアグリカンは実施例10-1に限定されず、本蛋白によりアグリカナーゼ切断部位で切断されるアグリカンの部分蛋白もしくは改変蛋白であればよい。アグリカナーゼ活性に用いる被験物質は、6) の金属プロテアーゼ活性で用いる被験物質と同様の物質が用いられる。

【 0 0 2 2 】

本発明には、新規蛋白または前記スクリーニング法により選択された新規蛋白の活性を有意に修飾する化合物、ペプチド及び抗体を有効成分とする医薬が包含される。

本発明の新規蛋白、新規蛋白の活性を有意に修飾する化合物、ペプチド、抗体または抗体断片を有効成分とする製剤は、該有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて調製されうる。

投与は錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、経口用液剤などによる経口投与、あるいは静注、筋注、関節注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、経粘膜投与剤などによる非経口投与が挙げられる。特に胃で消化されるペプチドに

あつては静注等の非経口投与が望まれる。

本発明による経口投与のための固体組成物は、一つ又はそれ以上の活性物質が少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合される。組成物は常法に従つて、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、溶解乃至溶解補助剤などを含有していてもよい。錠剤や丸剤は必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆していてもよい。

【0023】

経口のための液体組成物は、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エタノールを含む。該組成物は不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

非経口のための注射剤としては、無菌の水性または非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を含む。水溶性の溶液剤や懸濁剤には、希釈剤として例えば注射用蒸留水、生理用食塩水などが含まれる。非水溶性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としてはプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート80等を含む。該組成物はさらに湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解乃至溶解補助剤、防腐剤などを含んでいてもよい。組成物は例えばバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、または照射によって無菌化される。また、無菌の固体組成物を製造し、使用に際し無菌水その他の無菌用注射用媒体に溶解し使用することもできる。

投与量は前記スクリーニング法により選択された有効成分の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、性別等を考慮して適宜決定される。

【0024】

【実施例】

以下、本発明を更に具体的に説明する。

特に断りのない限り、公知の方法(Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989)等の遺伝

子操作実験マニュアルに従ったが、本発明は実施例に限定されるものではない。

【0025】

(実施例 1) 新規ADAMTS遺伝子MDTS6、MDTS7の部分配列の発見

ヒト脳由来cDNAライブラリーは文献 (Ohara O. et al., DNA Res., 4, 53-59, 1997) に示すように挿入配列の大きさによって厳密に分画されたものを構築した。これらのサブライブラリーのcDNA断片のサイズ分布は3kb - 8kbである。このライブラリーを構成するクローンの5'-及び3'-末端の配列を解読し、自家製のESTデータベースを構築した。この中から、MDTS6、MDTS7の部分配列を得た。

【0026】

(実施例 2) MDTS6の全長ORF配列の決定

MDTS6のcDNAクローンの配列を決定することにより、配列番号2の832番から2853番の配列を得た。配列番号2の1番から831番の配列は、Clontech社のヒト脳およびヒト胎盤のMarathon-ReadyTM cDNAを鋳型、LA-TaqTM (宝酒造社製) をDNAポリメラーゼとして、RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) を繰り返すことにより取得した。その結果、MDTS6は、配列番号1に示すように、TSP-1繰り返し配列を3個有し、950アミノ酸からなる新規ヒトADAMTS分子であることが判明した。

【0027】

(実施例 3) MDTS7の全長ORF配列の決定

MDTS7のcDNAクローン 2 種の配列を決定することにより、配列番号4の1945番から5808番の配列を得た。配列番号4の1番から1944番の配列は、実施例2同様、RACEと塩基配列の解析を繰り返すことにより取得した。その結果、MDTS7は、配列番号3に示すように、TSP-1繰り返し配列を15個有し、1935アミノ酸からなる新規ヒトADAMTS分子であることが判明した。

【0028】

(実施例 4) C末FLAG付加型発現ベクターの作製

pCEP4 (Invitrogen社製) を制限酵素ClaI、NsiIで切断し、平滑末端化後、自己連結反応を行い、EBNA1発現ユニットを除去した発現ベクターpCEP4dを作製した。このベクターを制限酵素NheI、BamHIで切断し、アガロースゲル抽出した約7.7Kbaの断片に、配列番号5で示される核酸と配列番号6で示される核酸をアニー

ルさせた重鎖オリゴヌクレオチドを挿入して、目的の配列を有するクローンを選択し、pCEP4d-FLAGと命名した。このベクターを鋳型、配列番号7で示されるオリゴDNA、配列番号8で示されるオリゴDNAをプライマーとして、PyroBestTM DNAポリメラーゼを用いてPCR反応を行った。生じた約0.4kbpのDNA断片を制限酵素SpeIで切断し、XbaIで切断したpCEP4d-FLAG（約7.7Kbp）に挿入し、目的通りプロモーターよりクローニングサイトのXbaI、NheI、NotI、BamHI認識配列そしてFLAGタグという順になっているクローンを選択して、pCEP4dE2-FLAGを完成した。

【 0 0 2 9 】

（実施例 5）MDTS6短長蛋白発現プラスミドの構築

配列番号1の1番から583番（MDTS6短長蛋白に相当する部分）をC末にFLAGを付加した蛋白として発現するためのプラスミドは以下の如く構築した。

まず、配列番号2の1番から1749番の遺伝子をPCRにより取得した。配列番号9と配列番号10で示されるオリゴDNAをプライマー、ヒト胎盤のMarathon-ReadyTM cDNAを鋳型、LA-TaqTM（宝酒造社製）をDNAポリメラーゼとして、94℃1分の後、98℃10秒、68℃2分のサイクルを10回行った。この反応液を50倍希釈したDNA溶液を鋳型として、PyroBestTM DNAポリメラーゼを用い、94℃2分の後、98℃10秒、66℃30秒、74℃4分のサイクルを40回、続いて72℃10分の条件でPCRを行った。こうして生成した5'側にXbaI認識配列およびKozak配列を、3'側にNotI認識配列が付加された目的断片をPCR-Bluntにサブクローンして配列を確認した後、制限酵素XbaI、NotIで切断し、pCEP4dE2-FLAGのXbaI、NotI部位に挿入して、pCEP-MDTS6TSP1-FLAGを完成した。

【 0 0 3 0 】

（実施例 6）MDTS6全長蛋白発現プラスミドの構築

配列番号1の1番から950番をC末にFLAGを付加した蛋白として発現するためのプラスミドは以下の如く構築した。

まず、配列番号2の1534番から2850番の遺伝子をPCRにより取得した。詳しくは、配列番号11と配列番号12で示されるオリゴDNAをプライマー、ESTクローンのプラスミドDNAを鋳型、PyroBestTM DNAポリメラーゼをDNAポリメラーゼとして、94℃1分の後、98℃10秒、50℃15秒、72℃2分のサイクルを20回、続いて72℃7分の

反応を行った。こうして生成した3'側にNotI認識配列が付加された目的断片をPCR-Bluntにサブクローンして配列を確認し、pCRB-MDTS6-3Hとした。

配列番号2の1566番から1571番にBamHI認識配列があることを利用し、pCEP-MDTS6TSP1-FLAGを制限酵素XbaI、BamHIで切断して生じた約1.6kbpのDNA断片と、pCRB-MDTS6-3HをBamHI、NotIで切断して生じた約1.3kbpのDNA断片を連結し、pCEP4dE2-FLAGのXbaI、NotI部位に挿入して、pCEP-MDTS6F-FLAGを完成した。

【0031】

(実施例7) MDTS7短長蛋白発現プラスミドの構築

配列番号3の1番から653番(MDTS7短長蛋白に相当する部分)をC末にFLAGを付加した蛋白として発現するためのプラスミドは以下の如く構築した。

まず、配列番号4の1番から1959番の遺伝子をPCRにより取得した。配列番号13と配列番号14で示されるオリゴDNAをプライマーとし、実施例5に示す条件でPCRを行った。この際、配列番号4の971番から1054番を欠くバリエーションがあることが判明した(図1～図3に示すMDTS7(d)は、MDTS7短長蛋白の該バリエーションが欠如した蛋白を示す。)。こうして生成した5'側にXbaI認識配列およびKozak配列を、3'側にNotI認識配列が付加された目的断片をPCR-Bluntにサブクローンして配列を確認した後、制限酵素XbaI、NotIで切断し、pCEP4dE2-FLAGのXbaI、NotI部位に挿入して、pCEP-MDTS7TSP1-FLAGを完成した。

【0032】

(実施例8) MDTS7全長蛋白発現プラスミドの構築

配列番号1の1番から1935番をC末にFLAGを付加した蛋白として発現するためのプラスミドは以下の如く構築した。

まず、配列番号2の1734番から3830番の遺伝子をPCRにより取得した。詳しくは、配列番号15と配列番号16で示されるオリゴDNAをプライマー、ヒト胎盤のMarathon-ReadyTM cDNAを鋳型、PyroBestTM DNAポリメラーゼをDNAポリメラーゼとして、94℃1分の後、98℃10秒、68℃2分のサイクルを40回、続いて68℃7分の反応を行った。同様に、配列番号2の3769番から5805番の遺伝子を、配列番号17と配列番号18で示されるオリゴDNAをプライマーとしたPCRにより取得した。こうして生成した2遺伝子断片をPCR-Bluntにサブクローンして配列を確認し、それぞ

れpCRB-MDTS7-3H1、pCRB-MDTS7-3H2とした。

配列番号2の1765番から1770番にBamHI認識配列、3797番から3802番にHincII認識配列があることを利用し、pCEP-MDTS7TSP1-FLAGを制限酵素XbaI、BamHIで切断して生じた約1.8kbpのDNA断片と、pCRB-MDTS6-3H1をBamHI、HincIIで切断して生じた約2.0kbpのDNA断片、pCRB-MDTS6-3H2をHincII、NotIで切断して生じた約2.0kbpのDNA断片を連結し、pCEP4dE2-FLAGのXbaI、NotI部位に挿入して、pCEP-MDTS7F-FLAGを完成した。

【 0 0 3 3 】

(実施例9) MDTS6短長蛋白、MDTS7短長蛋白の動物細胞株での発現

MDTS6短長蛋白、MDTS7短長蛋白いずれに関しても、(実施例5～8)においてpCEP4dE2-FLAGを骨格として作製した発現プラスミドをFuGENETM6 Transfection Reagent (Boeringer Mannheim社製)を用いて添付指示書に従いHEK293-EBNA細胞(invirogen社製)に導入した。プラスミド導入後、1-2日間培養して得た培養上清中に目的蛋白が存在することを、C末端に付加したFLAGタグに対する抗体(マウス抗FLAGモノクローナル抗体(M2; Sigma社製))を用いたウエスタンブロッティングで確認した。すなわち、上記培養上清をSDS/10%～20% アクリルアミドゲル(第一化学薬品社製)を用いて電気泳動後、ブロッティング装置を用いてPVDF膜に転写した。転写後のPVDF膜に、ブロックエース(大日本製薬社製)を添加してブロッキングした後、マウス抗FLAGモノクローナル抗体(M2; Sigma社製)、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIgGポリクローナル抗体(Zymed社製もしくはTAGO社製)を順次反応させた。または、ブロッキング後、ビオチン化M2抗体(Sigma社製)、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(A masham社製)を順次反応させた。反応後、ECLウエスタンブロッティング検出システム(アマシャムファルマシア社製)を用いて該蛋白の発現を確認した(図1)。また、MDTS6全長蛋白、MDTS7全長蛋白についても(実施例7)、(実施例8)で得られた発現プラスミドを用い、上記MDTS6短長蛋白等の蛋白発現と同様に得ることができる。

【 0 0 3 4 】

(実施例10) 動物細胞を宿主に発現したMDTS6短長蛋白、MDTS7短長蛋白の酵素活

性の検出

(実施例10-1) 組換えアグリカンG1G2の調製

報告されているヒトアグリカンの遺伝子配列 (Doege K, et al. Biochem Soc Trans., 18, 200-202, 1990) をもとに合成した配列番号19と配列番号20で示されるオリゴDNAをプライマー、ヒト胎盤のMarathon-ReadyTM cDNAを鋳型、PyroBestTM DNAポリメラーゼをDNAポリメラーゼとして、94℃1分の後、98℃10秒、68℃2分のサイクルを40回、続いて68℃7分の反応を行った。生成したDNA断片を制限酵素BamHIで切断し、pCEP-SigFlaのBamHI部位に導入し、ヒトアグリカンの球状ドメイン1 (G1) -球状ドメイン2 (G2) のN末にFLAGタグ、C末にHisタグの付加した蛋白を発現するために用いる発現プラスミドpCEP-rAggを作製した。pCEP-SigFlaはpCEP4dのHidIII、XhoI部位に配列番号21と配列番号22で示されるオリゴDNAの二重鎖を導入したものであり、プロモーターの下流に、文献 (Guan X-M. et al., J. Biol. Chem. 267, 21995-21998, 1992) に示されたインフルエンザウィルスのhemagglutinin由来の分泌シグナル配列とFLAGタグ配列、続いて、BamHI認識配列を有する発現ベクターである。

pCEP-rAggをHEK293-EBNA細胞に導入し、3-7日培養して目的蛋白を発現、生産した。培養液上清からの目的蛋白の精製は、N末端にFLAGタグが付加していることを利用して、アフィニティ精製した。すなわち、培養上清をカラムに詰めたM2-agarose (Sigma社製) にアプライし、20 mM Tris-HCl (pH 7.4) / 150 mM NaCl (以下、TBSという) で洗浄した後、0.1M Gly-HCl (pH 3.0) で、溶出、分画し、直ちに1M Tris-HCl (pH 8.0) で中和した。

【 0 0 3 5 】

(実施例10-2) MDTS6短長蛋白、MDTS7短長蛋白の組換えアグリカンG1G2分解活性の検出

(実施例9) において、発現プラスミド導入後12-16時間で培地を無血清に置換した後、さらに32-36時間培養を継続し、培養上清を回収した。この培養上清と上記で調製した組換えアグリカンを混合し、37℃で1夜反応させ、SDS-PAGE後、(実施例9) に記載した方法で、PVDF膜に転写、ブロッキング後、抗Hisx6ポリクローナル抗体 (sc-803; Santa Cruz Biotechnology社製)、西洋わさびパーオキ

シダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgGポリクローナル抗体（MBL社製）を順次反応させた。反応後、ECLウエスタンブロッティング検出システム（アマシャムファルマシア社製）を用いて組換えアグリカンを検出した。その結果、発現プラスミドのみを導入したコントロールではみられない組換えアグリカンの分解物が検出された（図2）。

【0036】

（実施例10-3）抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体による解析

アグリカナーゼはアグリカンのGlu373-Ala374の間を選択的に切断する金属プロテアーゼである。この切断により生じたC側のネオエピトープを認識する抗体を常法に従い、Ala-Arg-Gly-Ser-Val-Val-Leu-Thr-Ala-Lys-Cysからなる合成ペプチドとKLHとのコンジュゲートをマウスに5回免疫を繰り返すことにより調製した。（実施例10-2）と同様に転写、ブロッキングしたPVDF膜とこの抗体を反応させ、続いて、パーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgGポリクローナル抗体（Tago社製）と反応させた後、ECLウエスタンブロッティング検出システム（アマシャムファルマシア社製）を用いて検出した。その結果、MDTS6により生じた組換えアグリカンG1G2分解物が抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体と反応し、検出されたバンドの分子量は（実施例10-2）で検出された分解物の分子量と一致した（図3）。

【0037】

（実施例11）IL-1によるMDTS6 mRNAの発現誘導

マウス細胞株ATDC5はインスリン処理により軟骨様細胞へと分化することが知られている（Atsumi T. et al., Cell Differ. Dev. 30,109-116, 1990）。I型コラーゲンコート6ウエルプレート（旭テクノグラス社製）にATDC5細胞を 4×10^5 /wellで蒔き、DMEM/HamF12(1:1)/5%FCS培地で2日間培養した後、インスリン（終濃度30ng/ml）、50 μ g/ml L-アスコルビン酸含有DMEM/HamF12(1:1)/5%FCS培地に交換し5日培養を継続し、IL-1 β （終濃度5ng/ml）を添加して0、1、2、4、8時間処理した。各処理群よりISOGEN（日本ジーン社製）を用いてtotal RNAを調製し、その1 μ gを鋳型として、BcaBESTTM RNA PCR Kit（宝酒造社製）を用いRT-PCRを行った。逆転写反応は添付の指示書に従い、Oligo dT-Adaptor primerをプラ

イマーとして行い、PCRはMDTS6の3' 非翻訳領域の配列を基に合成した配列番号23および配列番号24で示されるオリゴDNAをプライマーとして、94℃2分の後、94℃30秒、60℃30秒、72℃30秒のサイクルを40回、続いて72℃7分の反応で行った。反応液を1%アガロースにて電気泳動し、生成した約0.3kbpのバンドの濃さを比較した。その結果、MDTS6 mRNAはIL-1により一過性に発現誘導されることが判明した(図4)。同じtotal RNAを鋳型としてADAMTS4およびADAMTS11についても検討したが、ヒト関節軟骨での結果(Flannery C.R., et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 260, 318-322, 1999)同様、mRNAレベルでの発現誘導は認められなかった。

【0038】

【発明の効果】

本発明で得られた新規な金属プロテアーゼは、プロテアーゼ活性を有することより、医薬、及び医薬として用いられる該プロテアーゼの活性を有意に修飾する化合物、ペプチド、抗体又は抗体断片のスクリーニングに用いられることを特徴としている。ここで、該プロテアーゼ及び該プロテアーゼの活性を有意に修飾する化合物、ペプチド、抗体又は抗体断片の医薬用途としては該新規蛋白活性の亢進、低下、変性等の異常に起因するあるいは該異常を発現・併発する疾患、例えば、癌、関節炎、変形性関節症などが挙げられる。また、本発明のプロテアーゼは、アグリカナーゼ活性を有することより、該プロテアーゼ及び該プロテアーゼの活性を有意に修飾する化合物、ペプチド、抗体又は抗体断片の医薬用途としては該新規蛋白活性の亢進、低下、変性等の異常に起因するあるいは該異常を発現・併発する疾患の内、特に関節炎、変形性関節症の予防・治療に有効であることが示唆される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は実施例9で得られた、ECLウエスタンブロッティング検出システムを用い、MDTS6短長蛋白(図中でMDTS6TSP1を示す)、MDTS7短長蛋白(図中でMDTS7TSP1を示す)の動物細胞株での発現結果を示す写真である。尚、ADM P1TSP1、ADMP2TSP1はそれぞれADAMTS4、ADAMTS11を示し、これら物質は(Tortorella M.D. et al., Science., 284, 1664-1666, 1999; Abbaszade I, et al.,

J. Biol. Chem., 274, 23443-23450, 1999) の文献 (以下「Tortorella文献」とする。) に記載の物質であり、該物質の配列、及び製造法は該文献に記載の通りである。

【図 2】 図 2 は実施例 10-2 で得られた、ECL ウェスタンブロッティング検出システムを用い、MDTS6 短長蛋白 (図中で MDTS6TSP1 を示す)、MDTS7 短長蛋白 (図中で MDTS7TSP1 を示す) の組換えアグリカン分解活性の検出結果を示す写真である。尚、ADMP1TSP1、ADMP2TSP1 はそれぞれ ADAMTS4、ADAMTS11 を示し、これら物質は Tortorella 文献に記載の物質を C 末に FLAG を付加させた蛋白として HEK293EBNA 細胞で発現させたものである。該物質の配列、及び製造法は該文献に記載の通りである。

【図 3】 図 3 は実施例 10-3 で得られた、ウェスタンブロッティング検出システムを用い、MDTS6 短長蛋白 (図中で MDTS6TSP1 を示す) 及び MDTS7 短長蛋白 (図中で MDTS7TSP1 を示す) の抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体による解析結果を示す写真である。尚、ADMP1TSP1、ADMP2TSP1 はそれぞれ ADAMTS4、ADAMTS11 を示し、これら物質は Tortorella 文献に記載の物質であり、該物質の配列、及び製造法は該文献に記載の通りである。

【図 4】 図 4 は実施例 11 で得られた、IL-1 による MDTS6、ADAMTS4、ADAMTS11 の各 mRNA の発現誘導の有無を確認した結果を示す電気泳動パターン写真である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> 新規な金属プロテアーゼ

<130> WP30552913

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 950

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Leu Leu Leu Gly Ile Leu Thr Leu Ala Phe Ala Gly Arg Thr Ala

1 5 10 15

Gly Gly Ser Glu Pro Glu Arg Glu Val Val Val Pro Ile Arg Leu Asp

20 25 30

Pro Asp Ile Asn Gly Arg Arg Tyr Tyr Trp Arg Gly Pro Glu Asp Ser

35 40 45

Gly Asp Gln Gly Leu Ile Phe Gln Ile Thr Ala Phe Gln Glu Asp Phe

50 55 60

Tyr Leu His Leu Thr Pro Asp Ala Gln Phe Leu Ala Pro Ala Phe Ser

65 70 75 80

Thr	Glu	His	Leu	Gly	Val	Pro	Leu	Gln	Gly	Leu	Thr	Gly	Gly	Ser	Ser
			85						90					95	
Asp	Leu	Arg	Arg	Cys	Phe	Tyr	Ser	Gly	Asp	Val	Asn	Ala	Glu	Pro	Asp
			100					105						110	
Ser	Phe	Ala	Ala	Val	Ser	Leu	Cys	Gly	Gly	Leu	Arg	Gly	Ala	Phe	Gly
			115					120						125	
Tyr	Arg	Gly	Ala	Glu	Tyr	Val	Ile	Ser	Pro	Leu	Pro	Asn	Ala	Ser	Ala
			130					135						140	
Pro	Ala	Ala	Gln	Arg	Asn	Ser	Gln	Gly	Ala	His	Leu	Leu	Gln	Arg	Arg
			145				150				155			160	
Gly	Val	Pro	Gly	Gly	Pro	Ser	Gly	Asp	Pro	Thr	Ser	Arg	Cys	Gly	Val
			165					170						175	
Ala	Ser	Gly	Trp	Asn	Pro	Ala	Ile	Leu	Arg	Ala	Leu	Asp	Pro	Tyr	Lys
			180					185						190	
Pro	Arg	Arg	Ala	Gly	Phe	Gly	Glu	Ser	Arg	Ser	Arg	Arg	Arg	Ser	Gly
			195					200						205	
Arg	Ala	Lys	Arg	Phe	Val	Ser	Ile	Pro	Arg	Tyr	Val	Glu	Thr	Leu	Val
			210					215						220	
Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Met	Val	Lys	Phe	His	Gly	Ala	Asp	Leu	Glu	His
			225				230					235		240	
Tyr	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu	Ala	Thr	Ala	Ala	Arg	Leu	Tyr	Arg	His	Pro
			245							250				255	
Ser	Ile	Leu	Asn	Pro	Ile	Asn	Ile	Val	Val	Val	Lys	Val	Leu	Leu	Leu
			260					265						270	
Arg	Asp	Arg	Asp	Ser	Gly	Pro	Lys	Val	Thr	Gly	Asn	Ala	Ala	Leu	Thr
			275					280						285	
Leu	Arg	Asn	Phe	Cys	Ala	Trp	Gln	Lys	Lys	Leu	Asn	Lys	Val	Ser	Asp
			290					295						300	
Lys	His	Pro	Glu	Tyr	Trp	Asp	Thr	Ala	Ile	Leu	Phe	Thr	Arg	Gln	Asp

305	310	315	320
Leu Cys Gly Ala Thr Thr Cys Asp Thr Leu Gly Met Ala Asp Val Gly			
325	330	335	
Thr Met Cys Asp Pro Lys Arg Ser Cys Ser Val Ile Glu Asp Asp Gly			
340	345	350	
Leu Pro Ser Ala Phe Thr Thr Ala His Glu Leu Gly His Val Phe Asn			
355	360	365	
Met Pro His Asp Asn Val Lys Val Cys Glu Glu Val Phe Gly Lys Leu			
370	375	380	
Arg Ala Asn His Met Met Ser Pro Thr Leu Ile Gln Ile Asp Arg Ala			
385	390	395	400
Asn Pro Trp Ser Ala Cys Ser Ala Ala Ile Ile Thr Asp Phe Leu Asp			
405	410	415	
Ser Gly His Gly Asp Cys Leu Leu Asp Gln Pro Ser Lys Pro Ile Ser			
420	425	430	
Leu Pro Glu Asp Leu Pro Gly Ala Ser Tyr Thr Leu Ser Gln Gln Cys			
435	440	445	
Glu Leu Ala Phe Gly Val Gly Ser Lys Pro Cys Pro Tyr Met Gln Tyr			
450	455	460	
Cys Thr Lys Leu Trp Cys Thr Gly Lys Ala Lys Gly Gln Met Val Cys			
465	470	475	480
Gln Thr Arg His Phe Pro Trp Ala Asp Gly Thr Ser Cys Gly Glu Gly			
485	490	495	
Lys Leu Cys Leu Lys Gly Ala Cys Val Glu Arg His Asn Leu Asn Lys			
500	505	510	
His Arg Val Asp Gly Ser Trp Ala Lys Trp Asp Pro Tyr Gly Pro Cys			
515	520	525	
Ser Arg Thr Cys Gly Gly Gly Val Gln Leu Ala Arg Arg Gln Cys Thr			
530	535	540	

Asn Pro Thr Pro Ala Asn Gly Gly Lys Tyr Cys Glu Gly Val Arg Val			
545	550	555	560
Lys Tyr Arg Ser Cys Asn Leu Glu Pro Cys Pro Ser Ser Ala Ser Gly			
	565	570	575
Lys Ser Phe Arg Glu Glu Gln Cys Glu Ala Phe Asn Gly Tyr Asn His			
	580	585	590
Ser Thr Asn Arg Leu Thr Leu Ala Val Ala Trp Val Pro Lys Tyr Ser			
	595	600	605
Gly Val Ser Pro Arg Asp Lys Cys Lys Leu Ile Cys Arg Ala Asn Gly			
610	615	620	
Thr Gly Tyr Phe Tyr Val Leu Ala Pro Lys Val Val Asp Gly Thr Leu			
625	630	635	640
Cys Ser Pro Asp Ser Thr Ser Val Cys Val Gln Gly Lys Cys Ile Lys			
	645	650	655
Ala Gly Cys Asp Gly Asn Leu Gly Ser Lys Lys Arg Phe Asp Lys Cys			
	660	665	670
Gly Val Cys Gly Gly Asp Asn Lys Ser Cys Lys Lys Val Thr Gly Leu			
675	680	685	
Phe Thr Lys Pro Met His Gly Tyr Asn Phe Val Val Ala Ile Pro Ala			
690	695	700	
Gly Ala Ser Ser Ile Asp Ile Arg Gln Arg Gly Tyr Lys Gly Leu Ile			
705	710	715	720
Gly Asp Asp Asn Tyr Leu Ala Leu Lys Asn Ser Gln Gly Lys Tyr Leu			
	725	730	735
Leu Asn Gly His Phe Val Val Ser Ala Val Glu Arg Asp Leu Val Val			
	740	745	750
Lys Gly Ser Leu Leu Arg Tyr Ser Gly Thr Gly Thr Ala Val Glu Ser			
755	760	765	
Leu Gln Ala Ser Arg Pro Ile Leu Glu Pro Leu Thr Val Glu Val Leu			

770	775	780
Ser Val Gly Lys Met Thr Pro Pro Arg Val Arg Tyr Ser Phe Tyr Leu		
785	790	795
Pro Lys Glu Pro Arg Glu Asp Lys Ser Ser His Pro Lys Asp Pro Arg		
805	810	815
Gly Pro Ser Val Leu His Asn Ser Val Leu Ser Leu Ser Asn Gln Val		
820	825	830
Glu Gln Pro Asp Asp Arg Pro Pro Ala Arg Trp Val Ala Gly Ser Trp		
835	840	845
Gly Pro Cys Ser Ala Ser Cys Gly Ser Gly Leu Gln Lys Arg Ala Val		
850	855	860
Asp Cys Arg Gly Ser Ala Gly Gln Arg Thr Val Pro Ala Cys Asp Ala		
865	870	875
Ala His Arg Pro Val Glu Thr Gln Ala Cys Gly Glu Pro Cys Pro Thr		
885	890	895
Trp Glu Leu Ser Ala Trp Ser Pro Cys Ser Lys Ser Cys Gly Arg Gly		
900	905	910
Phe Gln Arg Arg Ser Leu Lys Cys Val Gly His Gly Gly Arg Leu Leu		
915	920	925
Ala Arg Asp Gln Cys Asn Leu His Arg Lys Pro Gln Glu Leu Asp Phe		
930	935	940
Cys Val Leu Arg Pro Cys		
945	950	

<210> 2

<211> 2853

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgcttttgc tgggcatcct aaccctggct ttcgccgggc gaaccgctgg aggctctgag 60
 ccagagcggg aggtagtcgt tcccatccga ctggaccogg acattaacgg ccgccgctac 120
 tactggcggg gtcccgagga ctccggggat cagggactca tttttcagat cacagcattt 180
 caggaggact tttacctaca cctgacgccg gatgctcagt tcttggctcc cgccttctcc 240
 actgagcatt tgggcgtccc cctccagggg ctaccgggg gctcttcaga cctgcgacgc 300
 tgcttctatt ctggggacgt gaacgccgag cgggactcgt tcgctgctgt gagcctgtgc 360
 ggggggctcc gcggagcctt tggctaccga ggcgccgagt atgtcattag cccgctgccc 420
 aatgctagcg cgcggcgggc gcagcgcaac agccagggcg cacaccttct ccagcgccgg 480
 ggtgttccgg gcgggccttc cggagacccc acctctcgct gcgggggtggc ctccggctgg 540
 aaccccgcca tcttacgggc cctggaccct tacaagccgc ggccggcggg cttcggggag 600
 agtcgtagcc ggcgcaggtc tgggcgcgcc aagcggttctg tgtctatccc gcggtacgtg 660
 gagacgctgg tggctcgcca cgagtcattg gtcaagtctc acggcgcgga cctggaacat 720
 tatctgctga cgctgctggc aacggcgggc cgactctacc gccatcccag catcctcaac 780
 cccatcaaca tcgttgttgt caaggtgctg cttcttagag atcgtgactc cgggcccgaag 840
 gtcaccggca atgcggccct gacgctgcgc aacttctgtg cctggcagaa gaagctgaac 900
 aaagtgagtg acaagcacc caggtactgg gacactgcca tctcttcac caggcaggac 960
 ctgtgtggag ccaccacctg tgacaccctg ggcatggctg atgtgggtac catgtgtgac 1020
 cccaagagaa gctgctctgt cattgaggac gatgggcttc catcagcctt caccactgcc 1080
 cagcagctgg gccacgtgtt caacatgccc catgacaatg tgaaagtctg tgaggaggtg 1140
 tttgggaagc tccgagccaa ccacatgatg tccccgacc tcatccagat cgaccgtgcc 1200
 aacccttggc cagcctgcag tgcctccatc atcaccgact tcttgacag cgggcacggc 1260
 gactgcctcc tggaccaacc cagcaagccc atctccctgc ccgaggatct gccggcgccc 1320
 agctacaccc tgagccagca gtgcgagctg gcttttggcg tgggctccaa gccctgtcct 1380
 tacatgcagt actgcaccaa gctgtggtgc accgggaagg ccaagggaca gatggtgtgc 1440
 cagacccgcc acttccccctg ggccgatggc accagctgtg gcgagggcaa gctctgcctc 1500
 aaaggggcct gcgtggagag acacaacctc aacaagcaca ggggtggatgg ttcctgggcc 1560
 aaatgggatc cctatggccc ctgctcgcgc acatgtggtg ggggcgtgca gctggccagg 1620
 aggcagtgca ccaacccac ccttgccaac gggggcaagt actgcgaggg agtgagggtg 1680

aaataccgat cctgcaacct ggagccctgc cccagctcag cctccggaaa gagcttccgg 1740
 gaggagcagt gtgaggcttt caacggctac aaccacagca ccaaccggct cactctcgcc 1800
 gtggcatggg tgcccaagta ctccggcgtg tctccccggg acaagtgcaa gctcatctgc 1860
 cgagccaatg gcactggcta ctctatgtg ctggcaccca aggtgggtgga cggcacgctg 1920
 tgctctcctg actccacctc cgtctgtgtc caaggcaagt gcatcaaggc tggctgtgat 1980
 gggaacctgg gctccaagaa gagattcgac aagtgtgggg tigtgtggggg agacaataag 2040
 agctgcaaga aggtgactgg actcttcacc aagcccatgc atggctacaa tttcgtgggtg 2100
 gccatccccg caggcgcctc aagcatcgac atccgccagc gcggttacaa agggtgatc 2160
 ggggatgaca actacctggc tctgaagaac agccaaggca agtacctgct caacgggcat 2220
 ttcgtgggtg cggcgggtgga gcgggacctg gtggtgaagg gcagctctgct gcggtacagc 2280
 ggcaaggcca caggcgggtgga gagcctgcag gcttccccgc ccatcctgga gccgctgacc 2340
 gtggagggtc tctccgtggg gaagatgaca ccgccccggg tccgctactc ctctatctg 2400
 cccaaagagc ctccgggagga caagtcctct catcccaagg acccccgggg accctctgtc 2460
 ttgcacaaca gcgtcctcag cctctccaac cagggtggagc agccggacga caggccccct 2520
 gcacgctggg tggctggcag ctgggggccc tgctccgca gctgcggcag tggcctgcag 2580
 aagcgggcgg tggactgccg gggctccgcc gggcagcgca cggtcctgc ctgtgatgca 2640
 gcccatcggc ccgtggagac acaagcctgc ggggagccct gcccacctg ggagctcagc 2700
 gcctggtcac cctgtccaa gagctgcggc cggggatttc agaggcgctc actcaagtgt 2760
 gtgggccacg gaggccggt gctggccccg gaccagtgc acttgcaccg caagccccag 2820
 gagctggact tctgcgtcct gaggccgtgc tga 2853

<210> 3

<211> 1935

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Gln Phe Val Ser Trp Ala Thr Leu Leu Thr Leu Leu Val Arg Asp

1

5

10

15

Leu Ala Glu Met Gly Ser Pro Asp Ala Ala Ala Val Arg Lys Asp
 20 25 30
 Arg Leu His Pro Arg Gln Val Lys Leu Leu Glu Thr Leu Ser Glu Tyr
 35 40 45
 Glu Ile Val Ser Pro Ile Arg Val Asn Ala Leu Gly Glu Pro Phe Pro
 50 55 60
 Thr Asn Val His Phe Lys Arg Thr Arg Arg Ser Ile Asn Ser Ala Thr
 65 70 75 80
 Asp Pro Trp Pro Ala Phe Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ser Ser
 85 90 95
 Gln Ala His Tyr Arg Leu Ser Ala Phe Gly Gln Gln Phe Leu Phe Asn
 100 105 110
 Leu Thr Ala Asn Ala Gly Phe Ile Ala Pro Leu Phe Thr Val Thr Leu
 115 120 125
 Leu Gly Thr Pro Gly Val Asn Gln Thr Lys Phe Tyr Ser Glu Glu Glu
 130 135 140
 Ala Glu Leu Lys His Cys Phe Tyr Lys Gly Tyr Val Asn Thr Asn Ser
 145 150 155 160
 Glu His Thr Ala Val Ile Ser Leu Cys Ser Gly Met Leu Gly Thr Phe
 165 170 175
 Arg Ser His Asp Gly Asp Tyr Phe Ile Glu Pro Leu Gln Ser Met Asp
 180 185 190
 Glu Gln Glu Asp Glu Glu Glu Gln Asn Lys Pro His Ile Ile Tyr Arg
 195 200 205
 Arg Ser Ala Pro Gln Arg Glu Pro Ser Thr Gly Arg His Ala Cys Asp
 210 215 220
 Thr Ser Glu His Lys Asn Arg His Ser Lys Asp Lys Lys Lys Thr Arg
 225 230 235 240
 Ala Arg Lys Trp Gly Glu Arg Ile Asn Leu Ala Gly Asp Val Ala Ala

245	250	255
Leu Asn Ser Gly Leu Ala Thr Glu Ala Phe Ser Ala Tyr Gly Asn Lys		
260	265	270
Thr Asp Asn Thr Arg Glu Lys Arg Thr His Arg Arg Thr Lys Arg Phe		
275	280	285
Leu Ser Tyr Pro Arg Phe Val Glu Val Leu Val Val Ala Asp Asn Arg		
290	295	300
Met Val Ser Tyr His Gly Glu Asn Leu Gln His Tyr Ile Leu Thr Leu		
305	310	315
Met Ser Ile Val Ala Ser Ile Tyr Lys Asp Pro Ser Ile Gly Asn Leu		
325	330	335
Ile Asn Ile Val Ile Val Asn Leu Ile Val Ile His Asn Glu Gln Asp		
340	345	350
Gly Pro Ser Ile Ser Phe Asn Ala Gln Thr Thr Leu Lys Asn Phe Cys		
355	360	365
Gln Trp Gln His Ser Lys Asn Ser Pro Gly Gly Ile His His Asp Thr		
370	375	380
Ala Val Leu Leu Thr Arg Gln Asp Ile Cys Arg Ala His Asp Lys Cys		
385	390	395
Asp Thr Leu Gly Leu Ala Glu Leu Gly Thr Ile Cys Asp Pro Tyr Arg		
405	410	415
Ser Cys Ser Ile Ser Glu Asp Ser Gly Leu Ser Thr Ala Phe Thr Ile		
420	425	430
Ala His Glu Leu Gly His Val Phe Asn Met Pro His Asp Asp Asn Asn		
435	440	445
Lys Cys Lys Glu Glu Gly Val Lys Ser Pro Gln His Val Met Ala Pro		
450	455	460
Thr Leu Asn Phe Tyr Thr Asn Pro Trp Met Trp Ser Lys Cys Ser Arg		
465	470	475
		480

Lys Tyr Ile Thr Glu Phe Leu Asp Thr Gly Tyr Gly Glu Cys Leu Leu			
485	490	495	
Asn Glu Pro Glu Ser Arg Pro Tyr Pro Leu Pro Val Gln Leu Pro Gly			
500	505	510	
Ile Leu Tyr Asn Val Asn Lys Gln Cys Glu Leu Ile Phe Gly Pro Gly			
515	520	525	
Ser Gln Val Cys Pro Tyr Met Met Gln Cys Arg Arg Leu Trp Cys Asn			
530	535	540	
Asn Val Asn Gly Val His Lys Gly Cys Arg Thr Gln His Thr Pro Trp			
545	550	555	560
Ala Asp Gly Thr Glu Cys Glu Pro Gly Lys His Cys Lys Tyr Gly Phe			
565	570	575	
Cys Val Pro Lys Glu Met Asp Val Pro Val Thr Asp Gly Ser Trp Gly			
580	585	590	
Ser Trp Ser Pro Phe Gly Thr Cys Ser Arg Thr Cys Gly Gly Gly Ile			
595	600	605	
Lys Thr Ala Ile Arg Glu Cys Asn Arg Pro Glu Pro Lys Asn Gly Gly			
610	615	620	
Lys Tyr Cys Val Gly Arg Arg Met Lys Phe Lys Ser Cys Asn Thr Glu			
625	630	635	640
Pro Cys Leu Lys Gln Lys Arg Asp Phe Arg Asp Glu Gln Cys Ala His			
645	650	655	
Phe Asp Gly Lys His Phe Asn Ile Asn Gly Leu Leu Pro Asn Val Arg			
660	665	670	
Trp Val Pro Lys Tyr Ser Gly Ile Leu Met Lys Asp Arg Cys Lys Leu			
675	680	685	
Phe Cys Arg Val Ala Gly Asn Thr Ala Tyr Tyr Gln Leu Arg Asp Arg			
690	695	700	
Val Ile Asp Gly Thr Pro Cys Gly Gln Asp Thr Asn Asp Ile Cys Val			

705	710	715	720
Gln Gly Leu Cys Arg Gln Ala Gly Cys Asp His Val Leu Asn Ser Lys			
725	730	735	
Ala Arg Arg Asp Lys Cys Gly Val Cys Gly Gly Asp Asn Ser Ser Cys			
740	745	750	
Lys Thr Val Ala Gly Thr Phe Asn Thr Val His Tyr Gly Tyr Asn Thr			
755	760	765	
Val Val Arg Ile Pro Ala Gly Ala Thr Asn Ile Asp Val Arg Gln His			
770	775	780	
Ser Phe Ser Gly Glu Thr Asp Asp Asp Asn Tyr Leu Ala Leu Ser Ser			
785	790	795	800
Ser Lys Gly Glu Phe Leu Leu Asn Gly Asn Phe Val Val Thr Met Ala			
805	810	815	
Lys Arg Glu Ile Arg Ile Gly Asn Ala Val Val Glu Tyr Ser Gly Ser			
820	825	830	
Glu Thr Ala Val Glu Arg Ile Asn Ser Thr Asp Arg Ile Glu Gln Glu			
835	840	845	
Leu Leu Leu Gln Val Leu Ser Val Gly Lys Leu Tyr Asn Pro Asp Val			
850	855	860	
Arg Tyr Ser Phe Asn Ile Pro Ile Glu Asp Lys Pro Gln Gln Phe Tyr			
865	870	875	880
Trp Asn Ser His Gly Pro Trp Gln Ala Cys Ser Lys Pro Cys Gln Gly			
885	890	895	
Glu Arg Lys Arg Lys Leu Val Cys Thr Arg Glu Ser Asp Gln Leu Thr			
900	905	910	
Val Ser Asp Gln Arg Cys Asp Arg Leu Pro Gln Pro Gly His Ile Thr			
915	920	925	
Glu Pro Cys Gly Thr Asp Cys Asp Leu Arg Trp His Val Ala Ser Arg			
930	935	940	

Ser Glu Cys Ser Ala Gln Cys Gly Leu Gly Tyr Arg Thr Leu Asp Ile
 945 950 955 960
 Tyr Cys Ala Lys Tyr Ser Arg Leu Asp Gly Lys Thr Glu Lys Val Asp
 965 970 975
 Asp Gly Phe Cys Ser Ser His Pro Lys Pro Ser Asn Arg Glu Lys Cys
 980 985 990
 Ser Gly Glu Cys Asn Thr Gly Gly Trp Arg Tyr Ser Ala Trp Thr Glu
 995 1000 1005
 Cys Ser Lys Ser Cys Asp Gly Gly Thr Gln Arg Arg Arg Ala Ile Cys
 1010 1015 1020
 Val Asn Thr Arg Asn Asp Val Leu Asp Asp Ser Lys Cys Thr His Gln
 1025 1030 1035 1040
 Glu Lys Val Thr Ile Gln Arg Cys Ser Glu Phe Pro Cys Pro Gln Trp
 1045 1050 1055
 Lys Ser Gly Asp Trp Ser Glu Cys Leu Val Thr Cys Gly Lys Gly His
 1060 1065 1070
 Lys His Arg Gln Val Trp Cys Gln Phe Gly Glu Asp Arg Leu Asn Asp
 1075 1080 1085
 Arg Met Cys Asp Pro Glu Thr Lys Pro Thr Ser Met Gln Thr Cys Gln
 1090 1095 1100
 Gln Pro Glu Cys Ala Ser Trp Gln Ala Gly Pro Trp Gly Gln Cys Ser
 1105 1110 1115 1120
 Val Thr Cys Gly Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Ala Val Lys Cys Ile Ile
 1125 1130 1135
 Gly Thr Tyr Met Ser Val Val Asp Asp Asn Asp Cys Asn Ala Ala Thr
 1140 1145 1150
 Arg Pro Thr Asp Thr Gln Asp Cys Glu Leu Pro Ser Cys His Pro Pro
 1155 1160 1165
 Pro Ala Ala Pro Glu Thr Arg Arg Ser Thr Tyr Ser Ala Pro Arg Thr

1170	1175	1180	
Gln Trp Arg Phe Gly Ser Trp Thr Pro Cys Ser Ala Thr Cys Gly Lys			
1185	1190	1195	1200
Gly Thr Arg Met Arg Tyr Val Ser Cys Arg Asp Glu Asn Gly Ser Val			
1205	1210	1215	
Ala Asp Glu Ser Ala Cys Ala Thr Leu Pro Arg Pro Val Ala Lys Glu			
1220	1225	1230	
Glu Cys Ser Val Thr Pro Cys Gly Gln Trp Lys Ala Leu Asp Trp Ser			
1235	1240	1245	
Ser Cys Ser Val Thr Cys Gly Gln Gly Arg Ala Thr Arg Gln Val Met			
1250	1255	1260	
Cys Val Asn Tyr Ser Asp His Val Ile Asp Arg Ser Glu Cys Asp Gln			
1265	1270	1275	1280
Asp Tyr Ile Pro Glu Thr Asp Gln Asp Cys Ser Met Ser Pro Cys Pro			
1285	1290	1295	
Gln Arg Thr Pro Asp Ser Gly Leu Ala Gln His Pro Phe Gln Asn Glu			
1300	1305	1310	
Asp Tyr Arg Pro Arg Ser Ala Ser Pro Ser Arg Thr His Val Leu Gly			
1315	1320	1325	
Gly Asn Gln Trp Arg Thr Gly Pro Trp Gly Ala Cys Ser Ser Thr Cys			
1330	1335	1340	
Ala Gly Gly Ser Gln Arg Arg Val Val Val Cys Gln Asp Glu Asn Gly			
1345	1350	1355	1360
Tyr Thr Ala Asn Asp Cys Val Glu Arg Ile Lys Pro Asp Glu Gln Arg			
1365	1370	1375	
Ala Cys Glu Ser Gly Pro Cys Pro Gln Trp Ala Tyr Gly Asn Trp Gly			
1380	1385	1390	
Glu Cys Thr Lys Leu Cys Gly Gly Gly Ile Arg Thr Arg Leu Val Val			
1395	1400	1405	

Cys Gln Arg Ser Asn Gly Glu Arg Phe Pro Asp Leu Ser Cys Glu Ile			
1410	1415	1420	
Leu Asp Lys Pro Pro Asp Arg Glu Gln Cys Asn Thr His Ala Cys Pro			
1425	1430	1435	1440
His Asp Ala Ala Trp Ser Thr Gly Pro Trp Ser Ser Cys Ser Val Ser			
1445	1450	1455	
Cys Gly Arg Gly His Lys Gln Arg Asn Val Tyr Cys Met Ala Lys Asp			
1460	1465	1470	
Gly Ser His Leu Glu Ser Asp Tyr Cys Lys His Leu Ala Lys Pro His			
1475	1480	1485	
Gly His Arg Lys Cys Arg Gly Gly Arg Cys Pro Lys Trp Lys Ala Gly			
1490	1495	1500	
Ala Trp Ser Gln Cys Ser Val Ser Cys Gly Arg Gly Val Gln Gln Arg			
1505	1510	1515	1520
His Val Gly Cys Gln Ile Gly Thr His Lys Ile Ala Arg Glu Thr Glu			
1525	1530	1535	
Cys Asn Pro Tyr Thr Arg Pro Glu Ser Glu Arg Asp Cys Gln Gly Pro			
1540	1545	1550	
Arg Cys Pro Leu Tyr Thr Trp Arg Ala Glu Glu Trp Gln Glu Cys Thr			
1555	1560	1565	
Lys Thr Cys Gly Glu Gly Ser Arg Tyr Arg Lys Val Val Cys Val Asp			
1570	1575	1580	
Asp Asn Lys Asn Glu Val His Gly Ala Arg Cys Asp Val Ser Lys Arg			
1585	1590	1595	1600
Pro Val Asp Arg Glu Ser Cys Ser Leu Gln Pro Cys Glu Tyr Val Trp			
1605	1610	1615	
Ile Thr Gly Glu Trp Ser Glu Cys Ser Val Thr Cys Gly Lys Gly Tyr			
1620	1625	1630	
Lys Gln Arg Leu Val Ser Cys Ser Glu Ile Tyr Thr Gly Lys Glu Asn			

1635	1640	1645	
Tyr Glu Tyr Ser Tyr Gln Thr Thr Ile Asn Cys Pro Gly Thr Gln Pro			
1650	1655	1660	
Pro Ser Val His Pro Cys Tyr Leu Arg Asp Cys Pro Val Ser Ala Thr			
1665	1670	1675	1680
Trp Arg Val Gly Asn Trp Gly Ser Cys Ser Val Ser Cys Gly Val Gly			
1685	1690	1695	
Val Met Gln Arg Ser Val Gln Cys Leu Thr Asn Glu Asp Gln Pro Ser			
1700	1705	1710	
His Leu Cys His Thr Asp Leu Lys Pro Glu Glu Arg Lys Thr Cys Arg			
1715	1720	1725	
Asn Val Tyr Asn Cys Glu Leu Pro Gln Asn Cys Lys Glu Val Lys Arg			
1730	1735	1740	
Leu Lys Gly Ala Ser Glu Asp Gly Glu Tyr Phe Leu Met Ile Arg Gly			
1745	1750	1755	1760
Lys Leu Leu Lys Ile Phe Cys Ala Gly Met His Ser Asp His Pro Lys			
1765	1770	1775	
Glu Tyr Val Thr Leu Val His Gly Asp Ser Glu Asn Phe Ser Glu Val			
1780	1785	1790	
Tyr Gly His Arg Leu His Asn Pro Thr Glu Cys Pro Tyr Asn Gly Ser			
1795	1800	1805	
Arg Arg Asp Asp Cys Gln Cys Arg Lys Asp Tyr Thr Ala Ala Gly Phe			
1810	1815	1820	
Ser Ser Phe Gln Lys Ile Arg Ile Asp Leu Thr Ser Met Gln Ile Ile			
1825	1830	1835	1840
Thr Thr Asp Leu Gln Phe Ala Arg Thr Ser Glu Gly His Pro Val Pro			
1845	1850	1855	
Phe Ala Thr Ala Gly Asp Cys Tyr Ser Ala Ala Lys Cys Pro Gln Gly			
1860	1865	1870	

Arg Phe Ser Ile Asn Leu Tyr Gly Thr Gly Leu Ser Leu Thr Glu Ser

1875

1880

1885

Ala Arg Trp Ile Ser Gln Gly Asn Tyr Ala Val Ser Asp Ile Lys Lys

1890

1895

1900

Ser Pro Asp Gly Thr Arg Val Val Gly Lys Cys Gly Gly Tyr Cys Gly

1905

1910

1915

1920

Lys Cys Thr Pro Ser Ser Gly Thr Gly Leu Glu Val Arg Val Leu

1925

1930

1935

<210> 4

<211> 5808

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

atgcagtttg tatcctgggc cacactgcta acgctcctgg tgcgggacct ggccgagatg 60
 gggagcccag acgccgcggc ggccgtgcgc aaggacaggc tgcacccgag gcaagtgaag 120
 ttattagaga ccctgagcga atacgaaatc gtgtctccca tccgagtga cgctctcgga 180
 gaacccttcc ccacgaacgt ccacttcaaa agaacgcgac ggagcattaa ctctgccact 240
 gacccctggc ctgccttcgc ctctctctct tctctctcta cctctctcca ggcgcattac 300
 cgcctctctg ccttcggcca gcagtttcta tttaattcga ccgccaatgc cggattttatc 360
 gctccactgt tcaactgtac cctctctggg acgcccgggg tgaatcagac caagttttat 420
 tccgaagagg aagcgggaact caagcactgt ttctacaaag gctatgtcaa taccaactcc 480
 gagcacacgg ccgtcatcag cctctgctca ggaatgctgg gcacattccg gtctcatgat 540
 ggggattatt ttattgaacc actacagtct atggatgaac aagaagatga agaggaacaa 600
 aacaaacccc acatcattta taggcgcgac gccccccaga gagagccctc aacaggaagg 660
 catgcatgtg acacctcaga acacaaaaat aggcacagta aagacaagaa gaaaaccaga 720
 gcaagaaaaat ggggagaaag gattaacctg gctggtgacg tagcagcatt aaacagcggc 780
 ttagcaacag aggcattttc tgcttatggt aataagacgg acaacacaag agaaaagagg 840

acccacagaa ggacaaaacg ttttttatcc tatccacggt ttgtagaagt cttggtggtg 900
 gcagacaaca gaatggtttc ataccatgga gaaaaccttc aacactatat tttaacttta 960
 atgtcaattg tagcctctat ctataaagac ccaagtattg gaaatttaat taatattggt 1020
 attgtgaact taattgtgat tcataatgaa caggatgggc cttccatatac ttttaatgct 1080
 cagacaacat taaaaaactt ttgccagtgg cagcattcga agaacagtcc aggtggaatc 1140
 catcatgata ctgctgttct cttacaaga caggatatct gcagagctca cgacaaatgt 1200
 gataccttag gcctggctga actgggaacc atttgtgac cctatagaag ctgttctatt 1260
 agtgaagata gtggattgag tacagctttt acgatcgccc atgagctggg ccatgtgttt 1320
 aacatgcctc atgatgacaa caacaaatgt aaagaagaag gagttaagag tccccagcat 1380
 gtcatggctc caacactgaa cttctacacc aaccctgga tgttgtcaaa gtgtagtcga 1440
 aaatataica ctgagttttt agacactggt tatggcgagt gtttgcttaa cgaacctgaa 1500
 tccagaccct accctttgcc tgtccaactg ccaggcatcc tttacaacgt gaataaacia 1560
 tgtgaattga tttttggacc aggttctcag gtgtgccc ataatgatgca gtgcagacgg 1620
 ctctggtgca ataacgtcaa tggagtacac aaaggctgcc ggactcagca cacaccctgg 1680
 gccgatggga cggagtgcga gcctggaaag cactgcaagt atggattttg tgttcccaa 1740
 gaaatggatg tccccgtgac agatggatcc tggggaagt ggagtcctt tggaacctgc 1800
 tccagaacat gtggaggggg catcaaaaca gccattcgag agtgcaacag accagaacca 1860
 aaaaatggtg gaaaataactg ttaggacgt agaataaat ttaagtcctg caacacggag 1920
 ccatgtctca agcagaagcg agacttccga gatgaacagt gtgctcactt tgacgggaag 1980
 cattttaaca tcaacgggtc gcttcccaat gtgcgctggg tccctaaata cagtgaatt 2040
 ctgatgaagg accggtgcaa gttgttctgc agagtggcag ggaacacagc ctactatcag 2100
 cttcgagaca gagtgataga tggaactcct tgtggccagg acacaaatga tatctgtgtc 2160
 cagggccttt gccggcaagc tggatgcgat catgttttaa actcaaaagc ccggagagat 2220
 aaatgtgggg tttgtgggtg cgataattct tcatgcaaaa cagtggcagg aacatttaat 2280
 acagtacatt atggttacaa tactgtgtgc cgaattccag ctggtgctac caatattgat 2340
 gtgcggcagc acagtttctc aggggaaaca gacgatgaca actacttagc tttatcaagc 2400
 agtaaagggt aattcttgct aaatggaaac tttgttgtca caatggccaa aagggaatt 2460
 cgcatggga atgctgtggt agagtacagt ggggccgaga ctgccgtaga aagaattaac 2520
 tcaacagatc gcattgagca agaactttt cttcaggtt tgtcgggtgg aaagtgtac 2580

aaccccgatg tacgctattc tttcaatatt ccaattgaag ataaacctca gcagtttttac 2640
tggaacagtc atgggccatg gcaagcatgc agtaaaccct gccaaagggga acggaaacga 2700
aaacttgttt gcaccaggga atctgatcag ctactgttt ctgatcaaag atgcgatcgg 2760
ctgccccagc ctggacacat tactgaacct tgtggtacag actgtgacct gaggtggcat 2820
gttgccagca ggagtgaatg tagtgccag tgtggcttgg gttaccgcac attggacatc 2880
tactgtgcca aatatagcag gctggatggg aagactgaga aggttgatga tggtttttgc 2940
agcagccatc ccaaaccaag caaccgtgaa aaatgctcag gggaatgtaa cacgggtggc 3000
tggcgctatt ctgcctggac tgaatgttca aaaagctgtg acggtgggac ccagaggaga 3060
agggtctatt gtgtcaatac ccgaaatgat gtactggatg acagcaaagc cacacatcaa 3120
gagaaagtta ccattcagag gtgcagtgag ttcccttgtc cacagtggaa atctggagac 3180
tggtcagagt gcttgggtcac ctgtggaaaa gggcataagc accgccaggt ctggtgtcag 3240
tttgggtgaag atcgattaaa tgatagaatg tgtgaccctg agaccaagcc aacatctatg 3300
cagacttgtc agcagccgga atgtgcatcc tggcaggcgg gtccctgggg acagtgcagt 3360
gtcacttgtg gacagggata ccagctaaga gcagtgaat gcatcattgg gacttatatg 3420
tcagtggtag atgacaatga ctgtaatgca gcaactagac caactgatac ccaggactgt 3480
gaattacat catgtcatcc tccccagct gccccgaaa cgaggagaag cacatacagt 3540
gcaccaagaa cccagtggcg atttgggtct tggaccccat gctcagccac ttgtgggaaa 3600
ggtagccgga tgagatacgt cagctgccga gatgagaatg gctctgtggc tgacgagagt 3660
gccctgtgcta ccctgcctag accagtggca aaggaagaat gttctgtgac accctgtggg 3720
caatggaagg ccttggactg gagctcttgc tctgtgacct gtgggcaagg tagggcaacc 3780
cggcaagtga tgtgtgtcaa ctacagtgac cacgtgattg atcggagtga gtgtgaccag 3840
gattatatcc cagaaactga ccaggactgt tccatgtcac catgccctca aaggacccca 3900
gacagtggct tagctcagca ccccttccaa aatgaggact atcgtccccg gagcgccagc 3960
cccagccgca cccatgtgct cgggtggaaac cagtggagaa ctggcccctg gggagcatgt 4020
tccagtacct gtgctggcgg atcccagcgg cgtgttgtt tatgtcagga tgaaaatgga 4080
tacaccgcaa acgacttgtt ggagagaata aaacctgatg agcaaagagc ctgtgaatcc 4140
ggcccttgtc ctacgtgggc ttatggcaac tggggagagt gactaagct gtgtggtgga 4200
ggcataagaa caagactggt ggtctgtcag cgggtccaac gtgaacggtt tccagatttg 4260
agctgtgaaa ttcttgataa acctcccgat cgtgagcagt gtaacacaca tgcttgtcca 4320

cacgacgctg catggagtac tggcccttgg agctcgtgtt ctgtctcttg tggtcgaggg 4380
 cataaacaac gaaatgttta ctgcatggca aaagatggaa gccatttaga aagtgattac 4440
 tgtaagcacc tggctaagcc acatgggcac agaaagtgcc gaggaggaag atgccccaaa 4500
 tggaaagctg gcgcttggag tcagtgtctt gtgtcctgtg gccgaggcgt acagcagagg 4560
 catgtgggct gtcagatcgg aacacacaaa atagccagag agaccgagtg caaccatac 4620
 accagaccgg agtcggaacg cgactgccaa ggcccacggt gtcccctcta cacttggagg 4680
 gcagaggaat ggcaagaatg caccaagacc tgcggcgaag gctccaggta ccgcaagggtg 4740
 gtgtgtgtgg atgacaacaa aaacgagggt catggggcac gctgtgacgt gagcaagcgg 4800
 ccggtggacc gtgaaagctg tagtttgcaa ccctgcgagt atgtctggat cacaggagaa 4860
 tggtcagagt gctcagtgac ctgtggaaaa ggctacaaac aaaggcttgt ctctgtcagc 4920
 gagatttaca ccgggaagga gaattatgaa tacagctacc aaaccacat caactgcca 4980
 ggcacgcagc cccccagtgt tcacccctgt tacctgaggg actgccctgt ctcgccacc 5040
 tggagagtig gcaactgggg gagctgctca gtgtcttgtg gtgttggagt gatgcagaga 5100
 tctgtgcaat gtttaacaa tgaggaccaa cccagccact tatgccacac tgatctgaag 5160
 ccagaagaac gaaaaacctg ccgtaatgtc tataactgtg agttaccca gaattgcaag 5220
 gaggtaaaaa gacttaaagg tgccagtga gatggtgaat atttcctgat gattagagga 5280
 aagcttctga agatattctg tgcggggatg cactctgacc accccaaaga gtacgtgaca 5340
 ctggtgcatg gagactctga gaatttctcc gaggtttatg ggcacagggt acacaacca 5400
 acagaatgtc cctataacgg gagccggcgc gatgactgcc aatgtcggaa ggattacacg 5460
 gccgctgggt tttccagttt tcagaaaatc agaatagacc tgaccagcat gcagataatc 5520
 accactgact tacagtttgc aaggacaagc gaaggacatc ccgtcccttt tgccacagcc 5580
 ggggattgct acagcgtgc caagtgccca cagggtcgtt ttagcatcaa cttttatgga 5640
 accggcttgt ctttaactga atctgccaga tggatatcac aagggaatta tgctgtctct 5700
 gacatcaaga agtcgccgga tggtagccga gtcgtaggga aatgcggtgg ttactgtgga 5760
 aaatgcactc catcctctgg tactggcctg gaggtgcgag ttttatag 5808

<210> 5

<211> 50

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ctagcgcggc cgcaggatcc gactacaagg acgacgatga caaatgataa 50

<210> 6

<211> 50

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

gatcttatca tttgtcatcg tcgtccttgt agtcggatcc tgcggccgcg 50

<210> 7

<211> 34

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

ggactagtct agaagctggg taccagctgc tagc 34

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

ggactagtgt cgaccggtca tggctgcgc 29

<210> 9

<211> 42

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

gtgtctagag ccatgctttt gctgggcatc ctaaccctgg ct 42

<210> 10

<211> 41

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

agagcggccg cctgctctc ccggaagctc tttccggagg c 41

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

aagcacaggg tggatggttc ctgggcc 27

<210> 12

<211> 37

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

gcgcggccgc gcacggcctc aggacgcaga agtccag

37

<210> 13

<211> 42

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

gtgtctagag ccatgcagtt tgtatcctgg gccacactgc ta

42

<210> 14

<211> 41

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

agagcggccg cctgttcac tcggaagtct cgcttctgct t

41

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

tcccaaagaa atggatgtcc ccgtgac

27

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

tcactccgat caatcacgtg gtcactg

27

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

ggtagggcaa cccggcaagt gatgtgt

27

<210> 18

<211> 37

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

gcgcggccgc taaaactcgc acctccaggc cagtacc

37

<210> 19

<211> 37

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

taggatcctt gtagaaactt cagaccatga caactcg

37

<210> 20

<211> 59

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

atggatcctc aatggtgatg gtgatgatga ccgaagcaga aggcattggtg ccgggacag 59

<210> 21

<211> 97

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

agcttgccac catgaagacg atcatcgccc tgagctacat ctctgcctg gtattcgccg 60

actacaagga cgatgatgac aaggggatcc actagtc 97

<210> 22

<211> 97

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

tcgagactag tggatcccct tgtcatcadc gtcctttag tcggcgaata ccaggcagaa 60

gatgtagctc agggcgatga tcgtcttcat ggtggca 97

<210> 23

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

acctcagcag ccagctccct tgtatacaca

30

<210> 24

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

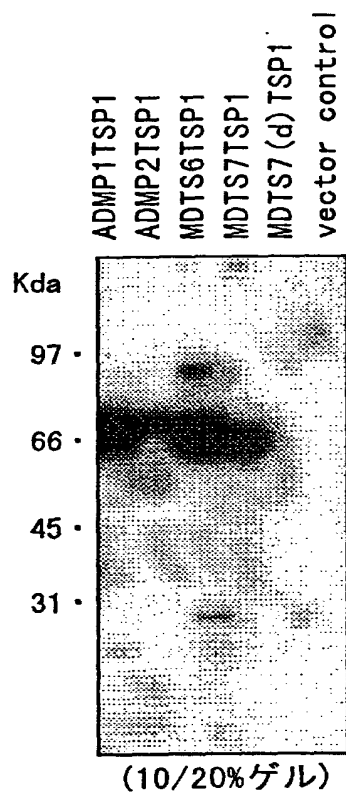
<400> 24

cttgaggggg atggaccaat acagctttgg

30

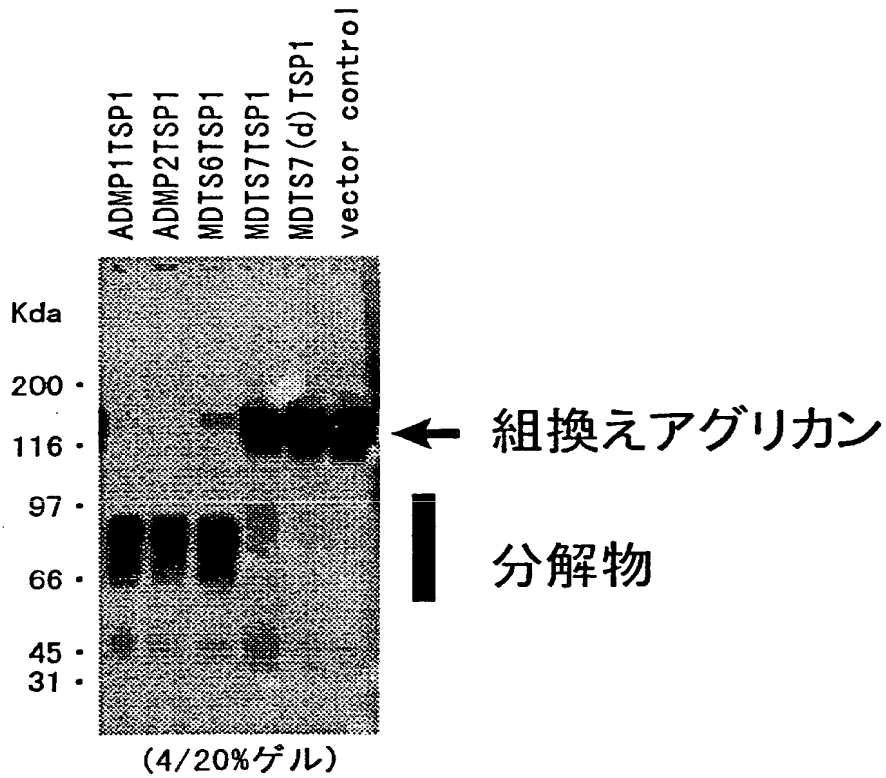
【書類名】 図面

【図 1】

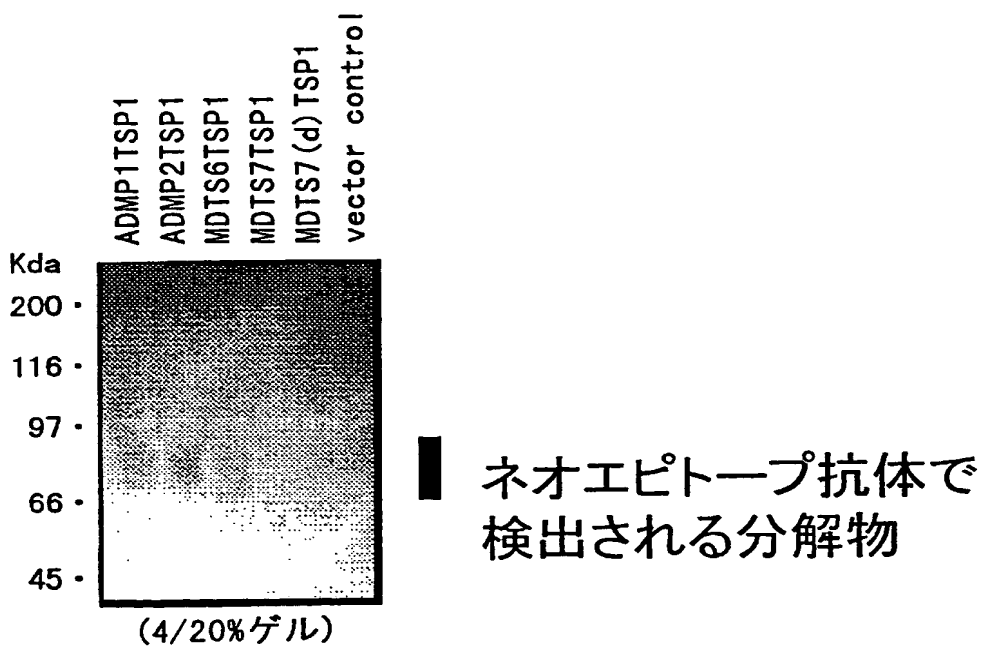


■ 組換えMDTS-TSP1

【図 2】



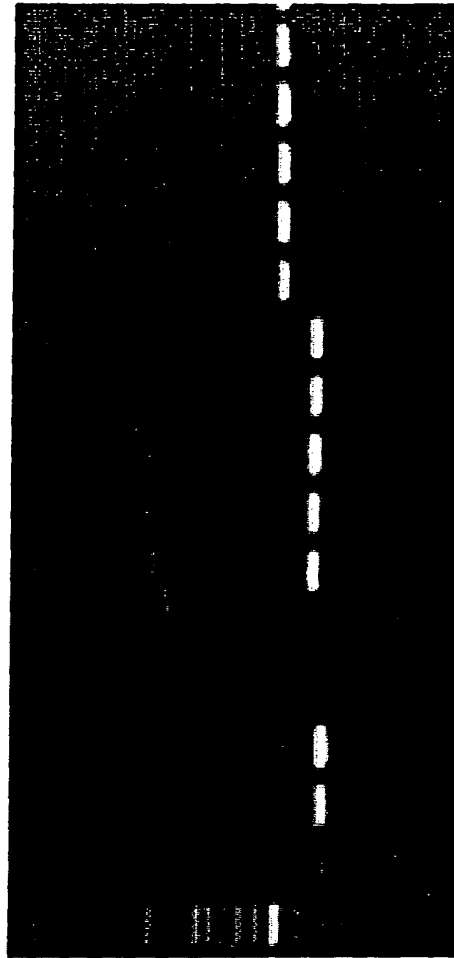
【図 3】



【図 4】

MDTS6 ADAMTS4 ADAMTS11

IL-1 処理 (時間) 0 1 2 4 8 0 1 2 4 8 0 1 2 4 8



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 創薬標的分子としての可能性が非常に高い、新規ADAMTS蛋白をコードする遺伝子を単離・同定し、それらの活性を修飾する物質を探索するために必要となる組換え蛋白の提供。

【解決手段】 ADAMTSファミリーに分類される新規蛋白をコードする遺伝子を単離し、全長ORF配列を決定して、該蛋白を発現させた。該遺伝子を含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該宿主細胞を用いた同蛋白の製造法、及び、該蛋白及び該蛋白の活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体のスクリーニング法を確立した。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	平成 1 1 年 特許願 第 3 2 1 7 4 0 号
受付番号	5 9 9 0 1 1 0 6 4 2 7
書類名	特許願
担当官	宇留間 久雄 7 2 7 7
作成日	平成 1 1 年 1 1 月 1 5 日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	000006677
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋本町 2 丁目 3 番 1 1 号
【氏名又は名称】	山之内製薬株式会社

【特許出願人】

【識別番号】	596175810
【住所又は居所】	千葉県木更津市矢那 1 5 3 2 - 3
【氏名又は名称】	財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所

【代理人】

【識別番号】	申請人
【住所又は居所】	100088616
【氏名又は名称】	東京都台東区浅草橋 3 丁目 2 0 番 1 8 号 第 8 菊 星タワービル 3 階 渡邊一平国際特許事務所 渡邊 一平

【選任した代理人】

【識別番号】	100089200
【住所又は居所】	東京都板橋区蓮根三丁目 1 7 番 1 号 山之内製薬 株式会社 特許情報部
【氏名又は名称】	長井 省三

【選任した代理人】

【識別番号】	100098501
【住所又は居所】	東京都板橋区蓮根三丁目 1 7 番 1 号 山之内製薬 株式会社 特許情報部
【氏名又は名称】	森田 拓

【選任した代理人】

【識別番号】	100109357
【住所又は居所】	東京都板橋区蓮根三丁目 1 7 番 1 号 山之内製薬 株式会社 特許情報部
【氏名又は名称】	矢野 恵美子

次頁無

【書類名】 手続補正書
【提出日】 平成11年11月24日
【あて先】 特許庁長官 近藤 隆彦 殿
【事件の表示】

【出願番号】 平成11年特許願第321740号
【補正をする者】

【識別番号】 000006677
【氏名又は名称】 山之内製薬株式会社

【補正をする者】
【識別番号】 596175810
【氏名又は名称】 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所

【代理人】
【識別番号】 100088616
【弁理士】
【氏名又は名称】 渡邊 一平

【手続補正 1】
【補正対象書類名】 特許願
【補正対象項目名】 提出物件の目録
【補正方法】 追加

【補正の内容】
【提出物件の目録】
【物件名】 委任状 3

29922200132



委任状

平成 11 年 10 月 27 日

私は、識別番号 100088616 弁理士 渡邊 一平 氏を以って
代理人として下記事項を委任します。

記

1. 発明の名称「新規金属プロテアゼ」の特許出願
(整理番号: WPI30552913)



に関する一切の件並びに本件に関する放棄若しくは取下げ、出願変更、拒絶査定
不服及び補正却下の決定に対する審判の請求並びに取下げ。

2. 上記出願又は 平成 年 願 号

に基づく「特許法第41条第1項及び実用新案法第8条第1項の」優先権主張並び
にその取下げ。

3. 上記出願の分割出願及び補正却下の決定に対する新たな出願に関する一切の件並
びに本件に関する上記事項一切。
4. 上記出願に関する審査請求、優先審査に関する事情説明書の提出、刊行物の提出、
実用新案技術評価の請求、証明の請求及び上記出願又は審判請求に関する物件の
下附を受けること。
5. 第1項及び第3項の出願に基づく特許権、実用新案権、意匠権又は商標権に関す
る一切の件並びに本特許権、実用新案権、意匠権又は商標権の放棄。
6. 第1項及び第5項に関する通常実施権許諾の裁定請求、裁定取消請求並びにそれ
等に対する答弁、取下其他本件に関する提出書類及び物件の下附を受けること。
7. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続を為すこと。
8. 上記事項を処理する為、復代理人を選任及び解任すること。

住 所 東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号

氏 名 山之内製薬株式会社
代表者 小野田 正愛



委任状

平成 11 年 10 月 27 日

私は、識別番号 100088616 弁理士 渡邊 一平 氏を以って
代理人として下記事項を委任します。

記

1. 発明の名称「新規な金属プロテアゼ」の特許出願
(整理番号: WP305529:3)



に関する一切の件並びに本件に関する放棄若しくは取下げ、出願変更、拒絶査定不服及び補正却下の決定に対する審判の請求並びに取下げ。

2. 上記出願又は 平成 年 願 号

に基づく「特許法第41条第1項及び実用新案法第8条第1項の」優先権主張並びにその取下げ。

3. 上記出願の分割出願及び補正却下の決定に対する新たな出願に関する一切の件並びに本件に関する上記事項一切。
4. 上記出願に関する審査請求、優先審査に関する事情説明書の提出、刊行物の提出、実用新案技術評価の請求、証明の請求及び上記出願又は審判請求に関する物件の下附を受けること。
5. 第1項及び第3項の出願に基づく特許権、実用新案権、意匠権又は商標権に関する一切の件並びに本特許権、実用新案権、意匠権又は商標権の放棄。
6. 第1項及び第5項に関する通常実施権許諾の裁定請求、裁定取消請求並びにそれ等に対する答弁、取下其他本件に関する提出書類及び物件の下附を受けること。
7. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続を為すこと。
8. 上記事項を処理する為、復代理人を選任及び解任すること。

住 所 千葉県木更津市矢部1532-3

氏 名 財団法人カザミディー・エヌ・エー研究所 理事長 平 岩 外 四



委任状

平成 11 年 10 月 27 日

私は、弁理士 長井 省三 氏(識別番号 10089200)、弁理士 森田 拓 氏(識別
番号 10098501)、及び弁理士 矢野 恵美子 氏(識別番号 10109357) を以って
代理人として、下記事項を委任します。

1号加入

2号加入



記

1. 発明の名称 「新規な金属プロテアーゼ」の特許出願

(整理番号: WP30552913)

に関する一切の件並びに本件に関する放棄若しくは取下げ、出願変更、拒絶査定
不服及び補正却下の決定に対する審判の請求並びに取下げ。

2. 上記出願に基づく「特許法第41条第1項及び実用新案法第8条第1項の」優先
権主張並びにその取下げ。

3. 上記出願の分割出願及び補正却下の決定に対する新たな出願に関する 一切の件
並びに本件に関する上記事項一切。

4. 上記出願に関する審査請求、優先審査に関する事情説明書の提出、刊行物の提出、
実用新案技術評価の請求、証明の請求及び上記出願又は審判請求に関する物件の
下附を受けること。

5. 第1項及び第3項の出願に基づく特許権、実用新案権、意匠権、又は商標権に関
する一切の件並びに本特許権、実用新案権、意匠権又は商標権の放棄。

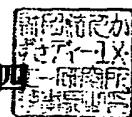
6. 第1項及び第5項に関する通常実施権許諾の裁定請求、裁定取消請求並びにそれ
等に対する答弁、取下其他本件に関する提出書類及び物件の下附を受けること。

7. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続を為すこと。

8. 上記事項を処理する為、復代理人を選任及び解任すること。

住所 千葉県 木更津市矢野1532-3

氏名 財団法人がずきディー・エヌ・エー研究所 理事長 平 岩 外 四



特平 11-321740

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第321740号
受付番号	29922200132
書類名	手続補正書
担当官	宇留間 久雄 7277
作成日	平成12年 1月12日

<認定情報・付加情報>

【提出された物件の記事】

【提出物件名】	委任状（代理権を証明する書面）	1
---------	-----------------	---

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006677]

1. 変更年月日 1990年 8月10日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号
氏 名 山之内製薬株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [596175810]

1. 変更年月日 1996年12月 5日

[変更理由] 新規登録

住 所 千葉県木更津市矢那 1532-3

氏 名 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所